

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2710159号

(45) 発行日 平成10年(1998) 2月10日

(24) 登録日 平成9年(1997)10月24日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
C 0 7 H 21/02			C 0 7 H 21/02	
G 0 1 N 33/532			G 0 1 N 33/532	Z
// C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A

発明の数4 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願昭62-502628  
(86) (22) 出願日 昭和62年(1987) 4月15日  
(65) 公表番号 特表平1-500005  
(43) 公表日 平成1年(1989) 1月12日  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 8 7 / 0 0 8 8 0  
(87) 国際公開番号 W O 8 7 / 0 6 2 7 0  
(87) 国際公開日 昭和62年(1987)10月22日  
(31) 優先権主張番号 8 5 2 , 6 9 2  
(32) 優先日 1986年4月16日  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999  
ザ・ソーク・インステテュート・フォー  
ー・バイオロジカル・スタディーズ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,  
ラ・ホーラ, ノース・トーレイ・バイン  
ズ・ロード 10010  
(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)  
審査官 平田 和男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複製型RNAリポーター・システム

1

(57) 【特許請求の範囲】

1. 試料中の生体高分子検体の存在を測定する方法であって、  
(i) 該試料を該検体にとっての親和性分子に、該親和性分子と該検体との間に結合が生じるような条件下にさらし；  
(ii) 該親和性分子が複製型RNAではない場合、段階 (i) の前か後のいずれかで、複製型RNAを段階 (i) で使用された親和性分子に結合させ；  
(iii) RNA依存RNAポリメラーゼを使用して、検体に結合される親和性分子に結合されるかまたは結合されていた、あるいは検体に結合されていた親和性分子である、複製型RNAの複製に触媒作用を及ぼし；そして  
(iv) 段階 (iii) の反応によってつくられたRNAを検出することからなる方法。

2

2. 検体が核酸であり、親和性分子が該検体の断片の配列に対して相補性である約20ないし約4000塩基の配列を有する断片を含む複製型RNAであり、該複製型RNAの複製は検体からの該RNAの解離後である請求の範囲第1項の方法。  
3. 複製型RNAの親和性分子への結合は、RNA依存RNAポリメラーゼによる複製可能性を失うことなく複製型RNAに結合された第1連結部分および親和性分子と検体との間の結合の特異性を失うことなく親和性分子に結合された第2連結部分によって行なわれ、該第1および第2連結部分は互いに共有的に結合されているか特異的結合対であるかのいずれかである請求の範囲第1項の方法。  
4. 親和性分子への複製型RNAの結合が、複製型RNAと、親和性分子に結合されるかそれに含まれている少なくとも長さ10塩基の核酸の断片とのハイブリダイゼーションに

よって行なわれる請求の範囲第1項の方法。

5. RNA依存RNAポリメラーゼがQβレプリカーゼであり、組換え複製型RNAが該レプリカーゼによるインビトロでの複製のための鋳型である請求の範囲第2項の方法。

6. 複製型RNAの複製が放射能標識リボヌクレオシド-5'-トリホスフェートによって行なわれ、得られた複製されたRNAが放射能標識されている請求の範囲第5項の方法。

7. RNA-依存RNAポリメラーゼがQβレプリカーゼであり、複製型RNAがインビトロでの該レプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第3項の方法。

8. 複製型RNAの複製は放射能標識リボヌクレオシド-5'-トリホスフェートによって行なわれ、得られた複製されたRNAが放射能標識されている請求の範囲第7項の方法。

9. 親和性分子を試料にさらす前に、第1連結部分および第2連結部分がジスルフィド部分によって互いに共有的に結合されている請求の範囲第8項の方法。

10. 第1連結部分が式 $-O-PO_3-NH-(CH_2)_n-S-$ （式中ホスホラミデート部分が複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、nが2~8である）で表わされ、第2連結部分が式 $-O-PO_3-NH-(CH_2)_m-S-$ （式中ホスホラミデート部分が核酸親和性分子の5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、mはnと同じでも異なってもよく、2~8である）で表わされる請求の範囲第9項の方法。

11. 親和性分子が少なくとも1つのプリン残基の断片を有する核酸であり、該断片は親和性分子の3'-末端にあって、親和性分子の検体結合断片の外側にあり、該親和性分子の3'-末端はホスホジエステルによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合される請求の範囲第8項の方法。

12. 親和性分子及び複製型RNAがスマートグローブにおいて組合せられる請求の範囲第9項の方法。

13. 第1連結部分と第2連結部分とが特異的結合対である請求の範囲第8項の方法。

14. 第1及び第2連結部分の一方がビオチニルであり、他方が、ビオチニルと複合体を形成することによって親和性分子または複製型RNAに結合されたアビジンである請求の範囲第13項の方法。

15. ビオチニル部分が式 $-O-PO_3-NH-(CH_2)_p-(S)_q-(CH_2)_r-NH-$ （式中上記ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pおよびrは同じか異なっており、各々2~8であり、qは0または1である。）のスペーサーアームによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合されている請求の範囲第14項の方法。

16. 親和性分子がビオチニル化された抗体であり、アビジンが複製型RNAに結合された該ビオチニルと複合体

を形成する請求の範囲第15項の方法。

17. 親和性分子がビオチニル化したレクチンであって、アビジンが複製型RNAに結合された該ビオチニルと複合体を形成する請求の範囲第15項の方法。

18. 親和性分子が、光化学的にフォトビチオンで、あるいは酵素的に、ウラシル部分のC-5によってビオチニルと結合されているdUTPまたはUTPあるいはアデニン部分のC-6またはC-8によってビオチニルに結合されているdATPで、あるいは化学的に5'-ヌクレオチドの5'-炭素において式 $-O-PO_3-NH-(CH_2)_s-(CH_2)_t-NH-$ （式中ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、sおよびuは同じか異なっており、各々2~8であり、tは0~1である）のスペーサーアームでビオチニル化された核酸であり、アビジンが複製型RNAに結合されたビオチニルと複合体形成している請求の範囲第15項の方法。

19. 親和性分子が5'-ヌクレオチドの5'-炭素でビオチニル化されている請求の範囲第18項の方法。

20. 複製型DNAに結合された親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、第1及び第2連結部分を共有的に結合しているジスルフィドを還元することによって親和性分子から複製型RNAが分離される請求の範囲第9項の方法。

21. 複製型RNAに結合した親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、第1および第2連結部分を共有的に結合しているジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAが分離される請求の範囲第10項の方法。

22. 複製型DNAに結合された親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、酸による脱プリン化とそれにつづくβ-脱離によってホスホジエステル結合を切断することにより親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第11項の方法。

23. 複製型DNAに結合した親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、第1と第2連結部分を共有的に結合しているジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第12項の方法。

24. スペーサー基のqが1であり、複製型RNAに結合された親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合しているスペーサーアームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAが分離される請求の範囲第15項の方法。

25. スペーサー基のqが1であり、複製型RNAに結合された親和性分子の検体への結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合するスペーサーアームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第16項の方法。

26. スペーサー基のqが1であって；複製型RNAに結合された親和性分子の検体への結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合するスペーサー

アームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第17項の方法。

27. スペーサー基のqが1であり；複製型RNAに結合された親和性分子の検体への結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合するスペーサーアームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第19項の方法。

28. RNA-依存RNAポリメラーゼがQβレプリカーゼであって、組換え複製型RNAがインビトロでの該レプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第4項の方法。

29. 親和性分子が核酸である請求の範囲第28項の方法。

30. RNA依存性RNAポリメラーゼにより複製せらるる複製型RNAに結合された目的の分子と特異的に結合せらるる親和性分子。

31. 複製型RNAの親和性分子への結合は、RNA依存RNAポリメラーゼによる複製可能性を失うことなく複製型RNAに結合された第1連結部分および親和性分子と検体との間の結合の特異性を失うことなく親和性分子に結合された第2連結部分によって行なわれ、該第1および第2連結部分は互いに共有結合されているか特異的結合対であるかのいずれかである請求の範囲第30項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

32. 複製型RNAがQβレプリカーゼによるインビトロでの複製のための鋳型である請求の範囲第31項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

33. 第2連結部分と第1連結部分が親和性分子および複製型RNAに各々共有的に結合し、ジスルフィド部分によって互いに共有的に結合されている請求の範囲第32項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

34. 第1連結部分が式 $-O-PO_2-NH-(CH_2)_n-S-$ （式中ホスホラミデート部分が複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、nが2～8である）で表わされ、第2連結部分が式 $-O-PO_2-NH-(CH_2)_m-S-$ （式中ホスホラミデート部分が核酸親和性分子の5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、mはnと同じでも異なってもよく、2～8である）で表わされる請求の範囲第33項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

35. 親和性分子が少なくとも1つのプリン残基の断片を有する核酸であり、該断片は親和性分子の3'-末端にあって、検体の標的断片の配列に対して相補性である配列を有する親和性分子の断片の外側にあり、該親和性分子の3'-末端はホスホジエステルによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合されている請求の範囲第32項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

36. 第1連結部分を第2連結部分が特異的結合対である請求の範囲第32項の親和性分子-複製型RNAハイブリ

ッド。

37. 第1及び第2連結部分の一方がビオチニルであり、他方が、ビオチニルと複合体を形成することによって親和性分子または複製型RNAに結合されたアビジンである請求の範囲第36項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

38. ビオチニル部分が式 $-O-PO_2-NH-(CH_2)_p-(S)_q-(CH_2)_r-NH-$ （式中上記ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pおよびrは同じか異なっており、各々2～8であり、qは0または1である。）のスペーサーアームによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合されている請求の範囲第37項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

39. 親和性分子はビオチニル化抗体である請求の範囲第38項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

40. 親和性分子がビオチニル化レクチンである請求の範囲第38項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

41. 親和性分子が、光化学的にフォトビオチンで、あるいは酵素的に、ウラシル部分のC-5によってビオチニルと結合されているdUTPまたはUTPあるいはアデニン部分のC-6またはC-8によってビオチニルに結合されているdATPで、あるいは化学的に5'-ヌクレオチドの5'-炭素において式 $-O-PO_2-NH-(CH_2)_s-(SS)_t-(CH_2)_u-NH-$ （式中ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、sおよびuは同じか異なっており、各々2～8であり、tは0～1である）のスペーサーアームでビオチニル化された核酸であり、アビジンが複製型RNAに結合されたビオチニルと複合体形成している請求の範囲第38項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

42. 親和性分子が5'-ヌクレオチドの5'-炭素でビオチニル化されている請求の範囲第41項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

43. 複製型RNAの親和性分子が、RNA依存RNAポリメラーゼによる複製可能性を失うことなく複製型RNAに結合された連結部分を介して結合しており、かつ前記連結部分は複製型RNAと親和性分子との間の結合を共有結合によってなすものである請求の範囲第30項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

44. RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製型RNAのインビトロでの複製可能性を失うことなしに、連結部分に結合された複製型RNAであって；該連結部分は、複製型RNAと親和性分子との間の結合を親和性分子と結合している連結部分への共有結合によって結合を行うことができるRNA依存性RNAポリメラーゼにより複製せらるるRNA。

45. インビトロでのQβレプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第44項の複製型RNA。

46. 複製型RNAが結合されている連結部分が硫黄、ビオチニル、または複合体形成によってビオチニルに結合

されたアビジン（一方このビオチニルは複製型RNAに結合されている）である請求の範囲第45項の複製型RNA。

47. 連結部分がビオチニルまたはアビジンであり、どちらの場合でも、ビオチニルが式 $-O-PO_2-NH-(CH_2)_p(SS)_q(CH_2)_rNH-$ （式中上記ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pおよびrは同じか異なっており、各々2~8であり、qは0または1である。）のスペーサーアームによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合されている請求の範囲第46項の複製型RNA。

48. 連結部分が硫黄であって式 $-O(PO_2)NH(CH_2)_p-$ （式中ホスホラミデート基は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pは2~8である）のスペーサー基によって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合される請求の範囲第46項の複製型RNA。

49. 核酸親和性分子に共有的に結合されたRNA依存性RNAポリメラーゼにより複製される複製型RNAからなるスマートプローブ。

50. 複製型RNAがQβレプリカーゼによる複製のための鋳型であり、複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素および親和性分子の5'-ヌクレオチドの5'-炭素は式 $-O(PO_2)NH(CH_2)_y(SS)(CH_2)_zNH(PO_2)O-$ （式中yとzは同じか異なっており各々2~8である）の部分によって結合されている請求の範囲第49項のスマートプローブ。

51. 親和性分子が5'-クランプ断片および3'-クランプ断片の両方を有する請求の範囲第50項のスマートプローブ。

52. 複製型RNAが親和性分子の3'-末端における断片の配列と相補性の配列をもつ断片を有する複製型組換えRNAである請求の範囲第50項のスマートプローブ。

53. 親和性分子が、該親和性分子に結合された、あるいはそれに含まれた少くとも10塩基の長さの核酸の断片と複製型RNAとのハイブリダイゼーションによって複製型RNAに結合されている請求の範囲第30項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

54. 複製型RNAがインビトロでのQβレプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第53項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

55. 親和性分子が蛋白質である請求の範囲第54項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

56. 親和性分子が核酸である請求の範囲第54項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

#### 【発明の詳細な説明】

本発明は、ポリ核酸及びポリペプチドを含む生体高分子のアツセイに向けられたものであり、より詳細には、RNA依存性RNAポリメラーゼにより触媒される自己複製の鋳型となるRNAに基づくリポーター・システムを用いるアツセイに関する。

本発明の背景

非常に大量の非関連物質を背景に含むサンプル中にある特定の少量の生体高分子を検索することが時々必要となる。いくつかの重要なケースとしては、感染した患者の血液や他の体液中に微量存在するウイルスや抗病原菌抗体についてのイムノ・アツセイとか、細胞表面に散在するレセプターについてのアツセイ、さらに、食品中に微量存在する病原菌、体液中に微量存在する病原性原生動物、バクテリア、ウイルス、或いは、ある種の全遺伝子DNA中の遺伝子の異常を示す決められた配列の短い断片についての核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アツセイなどがある。

そのようなアツセイの特異性は、サンプル中に試験されている本体（例えばウイルスとか、他の微生物、特別なレセプターをもつた細胞、異常遺伝子）が存在している限りにおいて、サンプル中に存在する生体高分子検体（即ち、特定の標的の生体高分子、又は、特定の標的部位、又は生体高分子の一部）に特異的に結合する親和性分子を用いることに依存している。親和性分子の例としては抗体を誘導するのに用いられる抗原となつているタンパク質の標的に対する抗体、又は、標的DNA又はRNAの標的部分と相補的な配列をもつオリゴ・ヌクレオチド、又は、抗原により誘導される抗体となつている抗体の標的に対する抗原、さらに、標的糖タンパク又は標的ポリ多糖のある特定の炭化水素部分に特異的に結合するレクチンなどがある。

アツセイしているサンプル中に存在する生体高分子検体のいずれかと結合した親和性分子の検出は、典型的には、リポーター・システムの一部分として検出するシグナルを発生するリポーター・グループを親和性分子と複合させるか、とりこませることによつてなされる。アツセイの感染は、アツセイ系における親和性分子と生体高分子検体の結合の特異性、と、アツセイ系における親和性分子だけからシグナルを生じさせるリポーター・システムの特異性、さらに、アツセイ系におけるリポーター・システムから生じたシグナルの強度に依存することになる。

典型的なリポーター・システムでは、リポーター・グループとして蛍光有機分子や $^{125}I$ でラベルしたリン酸基を用いている。リポーター・グループから直接生じるシグナルが係わってくる、このようなタイプのリポーター・システムによつて達成される感度は、根本的には検出するだけの強度のシグナルを生じさせるのに必要とするリポーター・グループの数によつて制限を受ける。従つて、これらのグループでは、約 $10^3$ 個以下の標的分子又は標的部分をアツセイして検出することはできない。生体高分子検体に対する非放射活性アツセイの感度は、親和性分子を連結した酵素を用いることにより改善されてきた。例えば、ビオチニル化（biotinylated）したオリゴヌクレオチド又はDNA親和性分子“プローブ（probe）”は、酵素に連結したアビジン（avidin）リポ-

ター・グループをビオチニル・グループと複合体を形成させ、次に、酵素によつて触媒される反応生成物を検出することにより検出される。Langerら、Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 78巻、6633-6637ページ (1981); Learyら、Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 80巻、4045-4049ページ (1983)。また、酵素に連結させたアビジンをイムノ・アッセイにおけるリポーター・グループとしたものに関しては、HeveyとMalmros、米国特許No.4,228,237を参照せよ。酵素を親和性分子と結合させ、さらにその酵素により触媒される反応の基質を供することにより、それぞれの酵素-親和性分子-検体の複合体について大量の数の生成分子を蓄積させ、それ故、原則的には、少数のリポーター分子を直接用いることによりよりもずっと大きな感度を得ることが可能となる。感度の高い色素法によつて容易にアッセイできるペルオキシダーゼ (peroxidase) やホスファターゼ (phosphatase) などの酵素は、酵素に結合したリポーター・グループとして広く利用されている。Learyら先に引用。

しかしながら、アビジンを連結したホスファターゼが係わつてくるような酵素付加リポーター・システムは、根本的には、リポーター・グループの酵素によつて触媒される反応がおこりうる速度によつて、感度において制限を受けることになる。実際の問題として、酵素触媒反応の生成物の検出しうる量とは、大体1時間から100時間といった適正な時間内のアッセイで生産されるものでなければならない。実際には、酵素-付加リポーター・システムは、<sup>32</sup>P崩壊に基づく、リポーター・システムより約10倍から100倍感度が劣る。

より感度に富み、標的生体高分子の単一分子、又は標的生体高分子断片の単一断片の存在までが、原則として、数時間たらずのアッセイで検出しうる程度のリポーター・システムが必要とされている。そのようなリポーター・システムでは、反応を通じて、検体分子又は断片あたり比較的短い時間内に莫大な数の生成分子を生産するような被検体の存在が必要となつてくる。

酵素によつて触媒される核酸の重合反応は鋳型から、相補配列をもつ鎖を生成し、この鎖はまた関連するポリメラーゼの基質になる。こうしてくり返し反応がおこることにより、特定のヌクレオチド鎖の数が対数的に増大するのである。従つて核酸の自己複製をリポーター・システムの感度の向上に用いるのは、有利である。

核酸の重合反応を、検出しうる微量の検体の検出に利用した例が、R.K.Saikiら、Science, 230巻、1350-1354ページ (1985年) 及びヨーロッパ特許出願広報No.0164054に記載されている。Saikiら、上述、はE.coli DNAポリメラーゼIとともに、dATP, dCTP, dGTP, dTTP, と、さらに2つの合成オリゴヌクレオチドプライマー即ち、1つは、センス鎖の3'末端の近くの部分に相補的な配列をもつもの、そしてもう一方は検体DNA断片のアンチ・センス鎖の3'末端の近くの部分に相補的な配列をもつもの

のを用いており、サンプル中の検体の量を標準的なDNAプローブ・アッセイ技術で容易に検出できるレベルまで増大させるのである。Saikiらの方法には、多数のサイクルからなるDNAポリメラーゼ-触媒複製、鎖の分離、さらにプライマー・アニーリングが含まれる。検体の量は、サイクル数に伴つて対数的に増加し、少なくとも複製の開始断片の濃度が、ポリメラーゼ分子の濃度を上回るまでになる。Saikiらにより記述される方法では、少なくとも3つの合成オリゴヌクレオチドが必要であり、2つはプライマーで、また少なくとも1つは検体を検出するプローブである。Saikiらの方法における複製の各サイクルは、3ステップからなる。従つて、Saikiらの方法ではDNAの自己複製を利用して検体の量を増大させることにより、DNAプローブ・アッセイの感度を増大させるのであるが、その一方で核酸の自己複製を通じて、生体高分子又はその特定の断片又はその部位に対するアッセイの感度を増大させるような、より簡便で、より一般的に応用可能な方法が依然として必要とされているのである。

20 酵素により触媒される、RNA配向性の、RNA重合は、相補鎖を迅速に生産し、しかもプライマーを必要としないのである。RNA鎖の数は、RNA配向性の、RNA重合の反応サイクルのくり返しにつれて対数的に増加していく。イン・ヒトロの他の重合反応と異なり、RNA配向性のRNA重合は、サイクル間に鎖の分離とプライマー・アニーリングを必要とすることなく、連続的に進行する。酵素によつて触媒される、RNA配向性のRNA重合は“自動触媒複製”と呼ばれてきた。

HarunaとSpiegelman, Science, 150巻、884-886ページ (1965年)。本発明があるまでは自動触媒複製を生体高分子検体の簡便で、広く応用可能で高感度のリポーター・システムに利用することができることは考えられていなかった。

30 Mieleら、J.Mol.Biol., 171巻、281-295ページ (1983年) では、デカアデニル酸部分を、突然変異中間変種-1 RNAの、バクテリオファージQβのRNA依存性RNAポリメラーゼ (“レプリカーゼ”) の機能には必須ではない位置への挿入を記述しており、さらに、組み換え中間変種-1 RNAが、レプリカーゼによる複製の鋳型として活性でありつづけることを報告している。Kramerら、米国特許出願No.614,350 (1984年5月25日整理) も参照せよ、これはここで参考文献に含まれている。Kramerらの出願は、中間変種及び同類のRNAに基づく、Qβレプリカーゼ活性による複製のための組み換えRNA鋳型と、さらに、そのような鋳型の、核酸ハイブリダイゼーション・プローブとしての利用について記述している。Mieleらの報文も、Kramerらの特許出願も、ともに、生体高分子検体のアッセイのリポーター・システムの基礎としての複製型RNA及びこれに関連したRNA依存性RNAポリメラーゼの利用について示唆していない。さらに、報文と特許出

願のどちらも、標的核酸断片のプロープとして用いられる組み換え複製型RNAが、標的とのハイブリダイゼーションにつづいて複製され、プロープを用いたアッセイの感度を増大させることについては示唆していない。

#### 本発明の要約

本発明は、ある種のRNAのイン・ビトロでの自動触媒複製が、生体高分子検体のアッセイの高感度のリポーター・システムとして利用可能である、という我々の発見に基いている。

従つて、本発明は、特定の生体高分子検体を検出するアッセイで、感度を高度に増強させたリポーター・システムに関する。このリポーター・システムは、バクテリオ・ファージQ $\beta$ のRNAポリメラーゼによるイン・ビトロでの複製が可能な、中間変種-1 RNA及びその突然変異体を含む、RNA配向性のRNAポリメラーゼによるイン・ビトロでの複製が可能なRNAの、迅速な、対数的な、酵素触媒による複製に基いている。

本発明のリポーター・システムは、そのような複製型RNAを親和性分子に加え、これがアッセイ中の生体高分子検体と特異的に結合することに係わっている。もし検体がポリヌクレオチドの断片である場合には、複製型RNAは、それによつて検体断片とハイブリダイゼーションがおこるような検体断片と相補的な配列をもつ、DNAまたはRNAで、断片を含むポリヌクレオチドあるいは、オリゴヌクレオチド親和性分子と、連結させることができる。もし検体が、例えば、ウイルスの外被タンパクとか、培養中の細胞の溶解に際して放出される興味あるタンパクなどのタンパク質である場合には、RNAはアッセイ・システム中の検体タンパクと特異的に結合する抗体親和性分子と連結させることができる。もし検体が、炭水素残基を含む糖タンパクとか、ポリ多糖のような分子である場合、複製型RNAは、炭水素残基と特異的に結合するレクチン親和性分子と連結させることができる。

複製型RNAは、親和性分子がアッセイ・システム中に存在するいずれかの生体高分子検体と複合体をつくる前に、又はつくつた後でも、親和性分子と結合させることができる。

なぜならば、複製型RNAが親和性分子と結合した後で、検体に結合した親和性分子を検出するためには、このRNAの複製が必要となるからである。ここでa) RNAは、結合している間でも、RNA依存性RNAポリメラーゼにより複製されることができるような様式で親和性分子と結合しているか、あるいは、b) RNAは、分離したRNAがRNA依存性ポリメラーゼによつて複製されることができるような形で、親和性分子から分離できるような様式をとつて親和性分子と結合しているのである。

親和性分子に結合した複製型RNAから複製されたRNA、即ち、今度はアッセイ・システム中の検体に結合しているRNAの検出は、数多くの既知の技術のいずれかを用い

て行うことができる。例えば、RNAの複製は、放射活性で標識したリボヌクレオシド-5'-三リン酸を用いて行なうことができ、次に複製の結果生じた放射活性をもつRNAを検出するのである。別の方法として、ビオチニル化したリボヌクレオシド-5'-三リン酸を複製過程の基質として用いることができ、さらに、その結果生じたビオチニル化したRNAは、例えばLearyら（先に引用）により開示されるように、酵素-アビジン付加物を利用して検出することができる。また、複製されたRNAは紫外線吸収や又は染色により、直接に検出することができる。

#### 本発明の詳細な記述

一面からみて本発明はサンプル中の検体の存在を決定する方法であり、これは、

- i) 親和性分子と検体の間で結合がおこるような条件下で、サンプルを上述の検体親和性分子にさらし、
- ii) もし上述の親和性分子、それ自体が、複製型RNAではない場合、ステップi)の前又は後で、複製型RNAを、ステップi)で用いた親和性分子に結合させ、
- iii) RNA依存性RNAポリメラーゼを用いて、検体に結合した親和性分子に結合している、又は、した複製型RNAあるいは、検体に結合している親和性分子である複製型RNAの複製を触媒させる、そして
- iv) ステップiii)の反応で生成したRNAを検出する、以上ステップから構成される。

他の側面からみると、本発明は親和性分子-複製型RNA混成分子、即ち、複製型RNAに結合した親和性分子を伴っている。親和性分子は複製型RNAに、RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製型RNAの複製をおこさせなくすることがないように、複製型RNAに共有結合した第1の連結部分を介して、さらに、新和性分子とその検体との特異的な結合を妨げないように複製型RNAに結合した第2の連結部分を介して、結合させることができるのである。また、ここで述べた第1と第2の連結部分は、お互いに共有結合しており、特異的な結合対を形成しているかあるいは、通常の第3の連結部分とも特異的な結合対を同時に形成しているのである。

本発明はまた、“スマートプローブ (smart probe)” を必然的に伴っており、即ち、これは、核酸である親和性分子が複製型RNAに結合していて、さらに、親和性分子が、その検体と結合していない場合には、複製型RNAがRNA依存性RNAポリメラーゼによる複製の鑄型として不活性であるように、複製型RNA部分と結合している化合物である。

本発明はさらに、塩基対を介して、複製型RNAに非共有的に結合している親和性分子を必然的に伴っている。

さらにまた一面からみると、本発明はRNA依存性のRNAポリメラーゼによる複製型RNAの複製を妨げることなく、連結部分に結合した複製型RNAに係わっており、ここでいう連結部分とはこれにより、他の連結部分対に結



合した複製型RNAと親和性分子との間の連結が特異的な結合対として、連結部分の共有的な結合により、あるいは、連結部分の相互作用により生じる、1対の連結部分のことである。

本発明に従う、一対の連結部分の1つに結合した、そのような複製型RNAは、検体との結合の特異性を失わないように他の連結部分対に結合したいかなる親和性分子に対しても、普遍的なリポーター・グループである。

“検体”とは、サンプル中でのその存在や濃度をアツセイで決定される物質のことを意味する。検体は時には、アツセイの標的物質、あるいは標的断片のことをさしている。本発明に従うアツセイでは、検体とは通常、生体高分子あるいは生体高分子の断片のことである。検体には、例えば糖タンパク、リポタンパク、酵素、ホルモン、レセプター、さらに抗原、抗体などのタンパク質や、核酸(DNA、RNA)、核酸の断片、そしてポリ多糖などを含んでいる。

本発明のアツセイでは検体は、もしそれが存在していれば、あるいは存在していさえすれば、サンプル中に存在する生物本体に関連していることもしばしばである。そのような生物本体には、ウィロイド(検体は核酸又はその断片である)；ウイルス(検体は例えばウイルス外被タンパク、ウイルス・ゲノム、ウイルス・ゲノムの断片、あるいはウイルスに対する抗体などである)；他の微生物(検体は例えば、微生物のゲノムの断片又は、RNA、微生物により生産される毒素、微生物に遺伝子工学を施したときに生産される異種タンパクなどである)

(原生動物寄生虫に関しては、Lizadi Noguiera, ヨーロッパ特許出願公報No.0135108を参照のこと)；がん細胞のような異常細胞(検体は例えば異常細胞の細胞表面抗原である)；あるいは、異常遺伝子(検体は例えば、遺伝子異常をおこす変調塩基を含む遺伝子断片とか、異常遺伝子から転写された結果生じる変調塩基を含むメッセンジャーRNA断片とか、又は、異常遺伝子が発現して生じた異常タンパクである)、以上が含まれる。検体はまた、例えば、ホルモンのような特定のタンパクでもありえ、その血清中や体液中の存在や濃度をアツセイで決定することになる。必然的に2つの抗体を使うことになるイムノ・アツセイの場合、検体は、(サンドイツアツセイの場合には)第一の抗体に結合した抗原であり、又は、(イムノソルベントアツセイの場合には)抗原に結合した第1の抗体になるであろう。多くの他のタイプの検体が技術に精通した者にとつては明らかであろう。

検体の記述から、本発明はイムノ・アツセイや核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アツセイに用いる応用も含んだ広い応用の可能性がある。こうして、他の応用の中でも、本発明は植物や、人間を含む動物の病気の診断に有用であり、さらに食物や血液、組織培養のような試料の汚染の検査に有用である。

検体に対する“親和性分子”とは検体に親和性をもつ

物質(あるいは、異つた名前をつけると、特異的に結合する物質)の分子のことである。特定の検体に特異的に結合する物質や、それらの調製方法は、本技術分野においてよく知られているところである。

抗原検体(それ自体抗体であるかもしれぬ)に対しては、モノクローナル抗体を含む抗体が、特異的結合物質として利用可能である。唯一つの抗体を含むサンプル中のある種の抗体検体に対しては、ブドウ球菌プロテインAのような抗体結合タンパクを特異的結合物質として用いることができる。

核酸(DNA又はRNA)あるいはその断片の検体については、検体の断片と相補的な配列の部分を含む、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド(双方とも、DNA又はRNA)を特異的結合物質として用いることができる。そうした親和性分子は自動合成技術を含むイン・ビボ(in vivo)又はイン・ビトロ(in vitro)の多くの既知の方法のいずれかにより合成することができる。技術分野において理解されているように、DNA又はRNA親和性分子が、アツセイにおける前もつて決定された特異性を発揮するために持たなければならない長さは、部分的には、アツセイしているサンプル中の核酸の量や複雑さに依存している。そのような親和性分子は通常、少なくとも10ヌクレオチドを必要とする。1つの糖タンパク又は一連の糖タンパク、あるいは、1つのポリ多糖又は一連のポリ多糖のような、レクチンに、特異的に結合する炭化水素部分をもつことによりサンプル中の他の物質と区別される検体については、適当な特異的結合物質はレクチンである。

ホルモンの検体については、ホルモンのレセプターを特異的結合物質として用いることができる。逆に、ホルモンのレセプターが検体のときは、ホルモンを特異的結合物質として用いることができる。

酵素の検体については、酵素の阻害物質を特異的結合物質として用いることができる。検体が酵素の阻害物質のときは、酵素を特異的結合物質として用いることができる。

通常、検体分子と検体分子に対する親和性分子は、特異的結合対として、即ち、これらの相互作用は非共有結合(例えば塩橋、水素結合、疎水的相互作用)のみを介しているものとして関係している。

熟練者は、サンプル中の親和性分子と、存在するかもしれぬ検体との間の結合がおこる条件を容易に決定することができる。詳細には、熟練者は技術分野において“特異的結合”と考えられている、親和性分子と検体との間の結合を生じさせることができる条件を容易に決定することができる。技術分野において理解されているように、そのような特異性は通常親和性分子がサンプル中の他の物質と構成物(例えば器壁や固体担体)よりも、検体に対してより高い特異性を示すことによる。

本発明のアツセイ方法を実行するサンプルは、血清

や、他の体液、又は組織培養培地や食料品のような生体物質の生のままの標本であることもありえる。より典型的には、本方法は、生の標本を親和性分子の非特異的結合を生じさせるなどして、検体の検出を妨げるような物質を取り除く各種の処理を施すことにより得られた、加工した標本のサンプルについて実施される。生の標本を加工して、本発明のアツセイ方法により適したサンプルを得るための方法は、技術分野においてよく知られている。

こうして、本方法は、GrunsteinとHogues, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 72巻、3961-3965ページ (1975年) (例えばFalkowとMoseley, 米国特許No. 4,358,535; 及びShafritz, 米国特許No. 4,562,159なども参照せよ) のコロニーハイブリダイゼーション法や、あるいは、BentonとDavis, Science, 196巻、180-182ページ (1977年) のブレイク・リフト法に従って細胞から得た核酸について実行することができる。本方法は、また、ウィロイドやウイルス、あるいは標本の細胞から単離され、固体担体上 (計量棒 (dipstick) 上の固体担体や、マイクロ稀釈プレート・ウェルの内壁なども含んでいる) に付着させた (GillespieとSpiegelman, J. Mol. Biol. 12巻、829-842ページ (1965年)) 核酸についても行うことができる。本方法はまた標本から単離され、“ドット (dot)”・プロットティング (Kafatosら, Nucleic Acid Res. 7巻、1541-1552ページ (1979年); WhiteとBancroft, J. Biol. Chem. 257巻、8569-8572ページ (1982年); サザン・プロットティング (Southern, J. Mol. Biol. 98巻、503-517ページ (1975年)); “ノーザン”プロットティング (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 77巻、5201-5205ページ (1980年)); さらに、エレクトロ・プロットティング (StellwaagとDahlberg, Nucleic Acids Res. 8巻、299-317ページ (1980年)) により固体担体上に固定された核酸についても行うことができる。

標本の核酸はまた、本発明を水層ハイブリダイゼーション (BrittenとKohre, Science 161巻、527-540ページ (1968年)) 及び水/有機中間層ハイブリダイゼーション (Kohreら, Biochemistry 16巻、5329-5341ページ (1977年)) に応用した方法によりアツセイすることもできる。水/有機中間層ハイブリダイゼーションは大変速い速度で進行する利点があるが、ヒオチンのような有機層に可溶性の連結部分が核酸親和性分子に結合している場合は適していない。

本発明のアツセイ方法はまた、標本から単離され、ドット・プロットティングや“ウエスタン”プロットティング (例えば、実施例XIを参照せよ)、又は、マイクロ稀釈プレート・ウェルや計量棒上の固体担体に吸着させることにより、固体担体上に固定されたタンパクやポリ多糖についても行うことができる。

さらにまた、本発明の方法は、標本の細胞性タンパクや全細胞表面のポリ多糖 (例えば、実施例XIを参照のこ

と)、あるいは、レプリカ・プレートのバクテリアや酵母のような、固体担体上に固定した微生物由来のタンパクやポリ多糖などの検出に応用できる。

親和性分子が、アツセイしているサンプル中に存在するかもしれない検体と結合する前か、又は後に、複製型RNAは親和性分子に結合しなければならない。

“複製型RNA”とは、イン・ビトロで自動触媒的に複製される、即ち、イン・ビトロでRNA依存性RNAポリメラーゼによつて触媒される反応により複製されうるいかなるRNAでもよい。本発明の実践に適したRNAポリメラーゼ及び複製型RNAは以下の実施例Iに記述されている。

これに関連して、ここで述べるバクテリオファージQ $\beta$ は、特定の変種や突然変異体やその個体群に限定されない。そのような言及は特に制限しないならば、バクテリオファージQ $\beta$ の感染が疑われるE.coliの感染に際して、RNA依存性のRNAポリメラーゼの生産を起こすいかなる変種や突然変異体やその個体群に対してなされている。

それによる感染が疑われるバクテリアの感染に際して、RNA依存性RNAポリメラーゼ及び、それに関連した本発明に利用可能な、イン・ビトロで自動触媒的に複製されることができる複製型RNAを生産する他のファージについては、例えばMiyakeら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 68巻、2022-2024ページ (1971年) を参照せよ。複製型RNAは多くの異なる方法により親和性分子に結合させることができるが、そのうちのいくつかについては実施例に記述されている。

もし、複製型RNAが、親和性分子が検体に結合する前に、親和性分子に結合するのであれば、熟練者によく理解されているように、親和性分子の検体に対する特異性が失われていないことが必須であり、即ち複製型RNAに結合した親和性分子は、アツセイにおいて試験されている検体にいくらかの特異的をもつて結合する能力を維持していなければならない。

もし複製型RNAが、親和性分子が検体に結合した後で親和性分子に結合するのであれば、これも熟練した者にはよく知られているように、複製型RNAの結合した親和性分子を、親和性分子に結合していない複製型RNAから分離できることが必須である。このことは重要な問題ではない。通常の場合、検体に結合し、さらに固体担体に結合した親和性分子について、そのような分離は単に洗浄することにより容易に達成される。なぜならば、複製型RNAが、結合した親和性分子に結合することは、親和性分子と固体担体との関係を大きくこわしてしまうことがないからである。もし通常のケースが得られない場合には、そのような分離は、よく知られたクロマトグラフィーや電気泳動の技術のいずれかにより容易に達成される。

最後に、複製型RNAの親和性分子への結合は、RNA依存性のRNAポリメラーゼによるRNAの複製能を失わせないよ



うなものでなければならない。即ち、親和性分子に結合している複製型RNAは、RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製の鋳型であるか、あるいは、親和性分子から分離されて、RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製の鋳型の形態をとっていることができるのである。

複製型RNAと親和性分子との間の関係の1つのタイプは、親和性分子自体が複製型RNAで、主に適当な配列をもった部分を含む組み換えRNAであるものである。そのような親和性分子は、核酸やその断片である検体にむいているであろう。親和性分子は複製型RNAから、好ましくは、Mieleら、先に引用、及びKramerら、米国特許出願番号No.614,350の方法により、検体の部分配列と相補的な配列を含むように調製された組み換えRNAであろう。この相補配列の部分は、特異性を与えるためには少なくとも、長さは10リボヌクレオチドあり、複製能を失わないためには長さは約4500ヌクレオチドまでのものである。実施例IXに組み換えRNAを親和性分子として用いる例が説明されている。

複製型RNAと親和性分子との間の結合は、非共有又は共有的な結合でありうる。

親和性分子と複製型RNAの間の非共有的な結合は、親和性分子に、複製型RNA断片の相補的な配列の核酸部分が結合するかとりこまれるかして、さらに複製型RNAが親和性分子に結合するかとりこまれた部分とハイブリダイズすることにより形成されることができる。そのような核酸断片を、タンパクの親和性分子に結合させるものについては、例えばDattaguptaら、ヨーロツバ特許出願広報No.0154884を参照せよ。核酸の親和性分子については、そのような断片を結合させたり、とりこませたりする方法は、技術分野においてよく知られている。親和性分子と複製型RNAとの間のそのような結合を用いて、複製型RNAが複製されて検出が可能になるような複製型RNAの検体に結合した親和性分子からの分離は、複製型RNA部分と親和性分子に結合した、あるいは、とりこまれた核酸部分との複合体の融解温度以上に加熱することにより達成される。

複製型RNAと親和性分子との間の非共有的な結合は、また、複製型RNAに結合した1番目の連結部分と、親和性分子に結合した2番目の連結部分の結合を通じて行われ、ここでいう連結部分とは特異的な結合対をさしている。

複製型RNAと親和性分子との間の共有的な結合は、唯一つ共有的な両者の間の結合（複合体の2次又は3次構造から生じた結合は除く）を通じて行われる。通常、共有的な結合は複製型RNAに共有結合した1番目の連結部分と、親和性分子に共有結合した2番目の連結部分と、さらに1番目と2番目の連結部分との間の共有結合が係わっている。

ここで述べた複製型RNA又は親和性分子に対する連結部分の“共有的な結合”又は“共有的な連結”又は“共

有的な接合”とは、連結部分とそれぞれの複製型RNA又は親和性分子との間の、2次又は3次構造から生じる結合以外のすべての結合が、共有的なものであることを意味している。ここで述べた、連結部分の複製型RNA又は親和性分子への“結合(joining)”、“連結(linkage)”、あるいは“接合(connection)”とは、無条件に、連結部分が“共有的に”又は“非共有的に”、それぞれ複製型RNAや親和性分子と結合したり連結したりすることを意味している。“非共有的な”結合、又は連結、接合とは、連結部分と複製型RNAや親和性分子との間の、2次、3次構造による結合以外の、少なくともいくつかの結合が非共有的なものであることを意味している。

連結部分と複製型RNAとの間の共有的な結合で、それによつてRNAの複製能が失われないもののいくつかの例として以下のものが含まれる。

(a) 連結部分は、リン酸基であり、結合は、リン酸と複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素との間の直接的なもの。複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合したリン酸連結部分は、通常、核酸親和性分子の3'-ヌクレオチドの3'-炭素へあるいは、核酸親和性分子の3'-末端に結合していると考えられている連結部分で、さらに、その5'-ヌクレオチドの5'-炭素におけるリン酸を介して親和性分子の3'-ヌクレオチドの3'-炭素に共有結合している核酸断片の3'-ヌクレオチドの3'-炭素への直接の共有結合が、係わっている。複製型RNAの5'末端ヌクレオチドは、技術分野において既知の方法により、5'炭素をT4ポリヌクレオチド・キナーゼでリン参加することができる。実施例Iも参照せよ。親和性分子、あるいは親和性分子の核酸連結部分は、次に、T4RNAリガーゼを用いる既知の方法により、複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-リン酸に接続することができる。この後者の反応は、もし、リボヌクレオチドが親和性分子（又は親和性分子の連結部分）の3'-末端であればより効率的に進行する；技術分野において知られているように、単一のリボヌクレオチド末端デオキシヌクレオチド転移酵素を用いて、DNAの3'-末端に付加させることができるのである。

(b) 連結部分がビオチン又はイミノビオチン(imino-biotinyl)で式-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>.NH(PO<sub>3</sub>)O-、式-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>.SS(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>.NH(PO<sub>3</sub>)O-、又は式-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>.CO(NH)(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>a</sub>.NH(PO<sub>3</sub>)O-のスペーサー・グループを介した複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に連結したものの、ここで、それぞれ、リン酸アミド基は5'-ヌクレオチドに、そして、アミノ基はビオチン又はイミノビオチンに結合しており、aaは2から20、bbとccは同じか又は異つており、それぞれ2から20である。式-NH(CO<sub>2</sub>)<sub>a</sub>.NH(PO<sub>3</sub>)O-のスペーサー・グループをもつた複製型RNAは、ChuとOrge1,DNA,4巻,327-331ページ(1985年)の

方法に従い合成することができる。式 $\text{--NH}(\text{CH}_2)_n\text{SS}(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{PO}_3)_2\text{O--}$ のスペーサー・グループをもつた複製型 RNA は、実施例 I に説明されている。式 $\text{--NH}(\text{CH}_2)_n\text{--}(\text{CO})(\text{NH})(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{PO}_3)_2\text{O--}$ のスペーサー・グループをもつた複製型 RNA は、複製型 RNA を、5' -ヌクレオチドの 5' -炭素に結合した式

$\text{--O}(\text{PO}_3)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$  基と式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$  のアミノ・カルボン酸の活性エステルと反応させることにより合成される。1 級アミノ基をもつたピオチン・アミド又はイミノピオチンアミド結合を生成させるピオチン又はイミノピオチンの N -ヒドロキシスクシンイミノ・エステル (N -hydroxysuccinimino) の反応は、技術分野において知られており、実施例で説明されている。

(c) 式 $\text{--}(\text{CH}_2)_n\text{--}(\text{NH})(\text{PO}_3)_2\text{O--}$ 又は $\text{--}(\text{CH}_2)_n\text{SS}(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{PO}_3)_2\text{O--}$ のスペーサー・グループを介して連結したアミノ基連結部分のものでここでリン酸アミド基は、複製型 RNA の 5' -ヌクレオチドの 5' -炭素に結合しており、aa, bb, 及び cc は前述のように定義される。そのような複製型 RNA の調製には、Chu と Orge1, DNA, 4 巻, 327-331 ページ、及び以下の実施例 I の方法が用いられる。

(d) 式 $\text{--}(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{PO}_3)_2\text{O--}$ のスペーサー・グループにより結合したイオウ連結部分のもので、ここでリン酸アミド基は複製型 RNA の 5' -ヌクレオチドの 5' -炭素に結合しており、cc は前述のように定義される。実施例 I と X では、そのような連結部分とスペーサーグループをもつた複製型 RNA の合成について説明している。

アビジンやストレプトアビジンの連結部分と、複製型 RNA の間の“非共有”結合の例は、アビジン又は、ストレプトアビジンがピオチン又はイミノピオチンと複合体を（ここで述べる複合体には非共有的な相互作用のみが係わっている）形成し、さらに、このピオチン又はイミノピオチンが先に述べたスペーサー・グループの 1 つにより複製型 RNA の 5' -ヌクレオチドの 5' -炭素に結合して複製型 RNA にピオチン又はイミノピオチンを共有的に結合させたものであろう。

核酸の親和性分子については、連結部分との共有結合は、5' -ヌクレオチドの 5' -炭素、3' -ヌクレオチドの 3' -炭素、あるいはピリミジン又はプリン塩基の各種原子を介して形成させることができる。連結部分は、検体の断片の配列と相補的な配列をもつた親和性分子の断片のそれぞれ 3' -、5' -末端から伸長する核酸断片の 3' 又は 5' 末端のヌクレオチドである。連結部分は、例えば、上述のスペーサー・グループの 1 つを介して、複製型 RNA の 5' -ヌクレオチドの 5' 炭素に結合するように、親和性分子の 5' -ヌクレオチドの 5' -炭素に結合した、ピオチン又はイミノピオチン、あるいは、硫黄原子であろう。ピオチン連結部分（複数のこともある）は、それにより親和性分子が検体にハイブリダイズする、検体の断片の配列と相補的な配列をもつ断片以外の核酸親和性分子の部分において、各種のス

ペーサー・アームを介してウラシル (uracil) 残基（複数のこともある）の 5 -炭素あるいはアデニン (adenine) 残基（複数のこともある）の 8 -炭素又は 6 -炭素に結合していることもあろう。例えば Ruth、特許協会条約広報 No. 84/03285; Brake1 と Starvianopoulos、ヨーロッパ特許出願広報 No. 0122614 を参照せよ。複製型 RNA については、親和性分子に適当な特に親和性分子の検体に対する親和性を失わせないように、多くの他の連結部分やスペーサー・グループ、さらに、そのような連結部分やスペーサー・グループをもつた親和性分子の調製方法などが、技術分野において知られている。

抗体、抗原あるいは、レクチンの親和性分子については、多くの連結部分（例えば、ピオチン、複製型 RNA のハイブリダイゼーションに用いる核酸断片、硫黄原子など）や、それらを、直接、又はスペーサー・グループを介して親和性分子に共有結合させる適当な方法が技術分野において知られている。例えば多くのピオチニル化された抗体やレクチンが購入可能である。

アビジン又はストレプトアビジンのような連結残基と、抗体、抗原、又はレクチン親和性分子との間の“非共有”結合の 1 つの例は、アビジン又はストレプトアビジンがピオチンやイミノピオチンと複合体をつくっており、これが、親和性分子に非共有的あるいは、共有的に連結したものである。例えばピオチンは、技術分野において理解されているように、ピオチニル化した抗 -抗体、又は、ピオチニル化したブドウ球菌プロテイン A と、抗体親和性分子の複合体を形成させることにより、非共有的に抗体親和性分子に結合させることができる。

技術における補足的な情報として、タンパクや核酸に連結残基を結合させる方法に関しては、例えば Dreyer と Dervan, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82 巻, 968-972 ページ (1985 年); Forster ら, Nucl. Acids, Res. 13 巻, 745-761 ページ (1984 年); Ward ら, ヨーロッパ特許出願広報 No. 0063879; Englehardt ら, ヨーロッパ特許出願広報 No. 0097373; Alagon と King, Biochemistry 19 巻, 4341-4345 ページ (1980 年); Imam ら, Cancer Res. 45 巻, 263-271 ページ (1985 年) を参照せよ。

複製型 RNA に結合した 1 番目の連結部分と親和性分子に結合した 2 番目の連結部分は、（2 つの硫黄原子連結部分から形成されるジスルフィド残基や、複製型 RNA の 5' -末端のリン酸に結合した核酸親和性分子の 3' -末端から伸長したヌクレオチドのように）相互に共有結合したり、あるいは、（アビジン又は、ストレプトアビジンに結合したピオチンやイミノピオチン、対応する抗体に結合した抗原、又は、酵素に結合した酵素阻害剤のように）特異的な結合対として相互に非共有的に相互作用することにより、複製型 RNA と親和性分子との間の結合を形成する。

先に示したように、親和性分子と複製型 RNA との間の共有結合の 1 つの例は、親和性分子がイン・ビトロで合

10

20

30

40

50

成される間か、又は、末端デオキシヌクレオチド転移酵素を用い、そして次に、T4RNAリガーゼを用いて、5'末端を介して（1つ又はそれ以上の）プリンの伸長3'-末端に複製型RNAを結合させる間に、DNA親和性分子の3'-末端に付加された伸長プリン残基を介して形成される結合である。技術分野において理解されているように、この連結部分の3'-末端におけるプリン・ヌクレオチドは、複製型RNAへの付加を効率よく進行させるためには、リボヌクレオチドであるべきである。そのような親和性分子-複製型RNAハイブリッドが検体に結合した後で、もし、これがRNAレプリカーゼの鋳型として活性できないときには、酸脱プリン反応、次にβ-脱離によりリン酸ジエステル結合を開裂させて、RNAをDNAから解離させることができ、そこでレプリカーゼの鋳型として用いることができる。

他の例には、T4RNAリガーゼを用いて、RNA親和性分子を複製型RNAのどちらかの末端に結合させるものがある。そのような分子は、複製型RNAと、検体とハイブリダイズする親和性分子の断片との間に、多少のリボヌクレオチドをもつように調製される。その結果得られたRNAは、もし親和性分子RNAが複製型RNAの5'-末端に付加しているのであれば、それ自体RNAレプリカーゼの鋳型となることができる。もし、その結果得られたRNAが、レプリカーゼの鋳型とはならない場合、親和性分子部分は、複製型RNA部分から解離させ複製型RNAを放出させる。そのような解離は、初めに、複製型分子と、検体にハイブリダイズする親和性分子部分の間の断片と相補的な配列をもつオリゴデオキシリボヌクレオチドと、分子をハイブリダイズさせ、（検体にハイブリダイズさせるか、又は検体にハイブリダイズさせた後、加熱する（又は融解する）ことにより遊離させ）、次に、RNAがDNAとハイブリダイズする位置で特異的にRNAを切断するリボヌクレアーゼHを用いて、開裂させるのである。Donis-Keller, Nucl. Acids Res. 7巻、179-192ページ（1979年）を参照せよ。

本発明に従う、親和性分子-複製型RNAハイブリッド化合物（即ち、親和性分子が複製型RNAに結合している化合物）の中には、“スマート・プローブ”がある。“スマート・プローブ”とは、親和性分子が核酸であり、2番目の連結部分が親和性分子に共有結合しており、1番目の連結部分が複製型RNAに共有結合している、さらに1番目と2番目の連結部分が相互に共有結合している親和性分子-複製型RNAハイブリッド分子のことである（即ち、2次、3次構造による結合を除いて、2つの連結部分の間のすべての結合は共有である）。さらにスマート・プローブでは、親和性分子と2つを結合している1番目と2番目の連結部分、さらにこの2つの連結部分を結合しているいかなる部分も、理想的には、もし親和性分子部分が検体にハイブリダイズしていれば、あるいは、しているときだけハイブリッド分子の

複製型RNAが、RNA依存性のRNAポリメラーゼにより複製されるようになっているのである。要するに、このプローブはそれ自体検体と結合して検出を可能にするから“スマート”なのである。

本発明に従ったスマートプローブの1つの具体例は、複製型RNA部分が親和性分子部分の3'-末端断片の配列と相補的な配列をもつ、約10から30のリボヌクレオチドの短い断片を含む組み換え複製型RNAのものである。この組み換え複製型RNAは、例えば、Mielら、先に引用、及び、クラマー（Kramer）ら、米国特許出願番号No. 614,350先に引用、の方法に従って合成する。親和性分子部分は、典型的には約75から150ヌクレオチドの長さで、これは、複製型RNA部分に組み換えられた部分の配列と相補的な配列をもつ部分よりもいくぶん長く、さらにこれは、技術分野において既知の多くのイン・ビトロやイン・ビボの方法のいずれかにより合成される。組み換え複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素と親和性分子部分の5'-ヌクレオチドの5'-炭素は、実施例I及びXの方法に従い、式-O(PQ<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>SS(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>NH(PQ<sub>2</sub>)O-の部分によりスマート・プローブ中に結合させる。ここでaとbは同じか、または異なるものであり、それぞれ2から20である。そのようなスマート・プローブでは、親和性分子部分が何か他のものとより安定に結合していない場合（そのような結合は、実質的には、検体との特異的な結合か又は、非特異的な結合だけである）、親和性分子部分の3'-末端は、組み換えRNA部分とハイブリダイズしたままになっている。プローブの使用に際しては、初めにサンプルの核酸とのハイブリダイゼーションを行い、次にリボヌクレアーゼHの溶液を加えると、親和性分子部分が複製型RNA部分から解離していないスマート・プローブの、複製型RNA部分の開裂と複製能の喪失がおこる（Donis-Keller（1979年）、先に引用、を参照せよ）；次に結合していないスマート・プローブを除くために短い洗浄を行い、さらに親和性分子部分が、複製型RNAがリボヌクレアーゼHによる開裂を受けないように、複製型RNAから解離してしまっている、少量の非特異的結合をおこしたスマート・プローブの量を減ずる；そして最後に、ジチオスレイトール（dithiothreitol）でジスルフィド結合を開裂して、複製型RNAを親和性分子から解離させた後で、RNAを複製し、複製したRNAを検出することにより検出を行うのである。

本発明のスマート・プローブのもう1つの具体例では、標的とハイブリダイズしていないプローブの複製型RNAを不活性化するのにリボヌクレアーゼHによる開裂を必要としていない。この具体例では、親和性分子部分の5'-ヌクレオチドの5'-炭素は、他の具体例と同様に、式-O(PQ<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>SS(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>NH(PQ<sub>2</sub>)O-の部分により、複製型RNA部分の5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合している。この具体例では、どんな複製型RNA

をも用いることができる。親和性分子部分に対応する組み換え複製型RNAを調製する必要はない。しかしながらこの具体例では、親和性分子部分は、本質的に以下の3つの部分から構成されている：即ち、親和性分子がハイブリダイズする検体の部分配列を相補的な配列中の約50から150ヌクレオチドからなる“検体-結合”部分；親和性分子の5'-ヌクレオチドから、検体結合部分の5'-ヌクレオチドへ伸長し、（しかしこの部分を含んではない）、複製型RNAの部分の配列と相補的な配列中の約30から60ヌクレオチドからなる“5'-クランプ（clamp）”部分；そして、検体-結合部分の3'-ヌクレオチド（しかし、この部分は含まない）から、親和性分子の3'-ヌクレオチドへ伸長し、親和性分子の5'-クランプ部分がハイブリダイズする部分よりも、さらに、複製型RNAの5'-末端に近接する複製型RNAの部分と相補的な配列中の、約30から60ヌクレオチドからなる“3'-クランプ”部分である。

技術分野において知られている方法による、この具体化では随意に、親和性分子の5'-クランプ部分及び3'-クランプ部分とハイブリダイズする複製型RNA部分の少なくともいくつかのグアノシン塩基はイノシンで置換することができる。この効果は、（クランプしていない）複製型RNAを複製の鋳型として活性なものとし、さらに、これら複製型RNA部分で、DNA-RNA塩基対を安定化し、逆にRNA-RNA塩基対を不安定なものにすることである。この具体例の親和性分子は、他の場合と同様に、既知のイン・ヒトロ又はイン・ヒボの方法により合成される。複製型RNA部分の親和性分子部分への連結は、実施例I及びXに従って行う。この具体例では、親和性分子の3'-クランプ部分と5'-クランプ部分の双方が、複製型RNAにハイブリダイズしている間、複製型RNAは非複製型に“クランプ”されており、複製の鋳型として不活性である。一度、スマート・プローブが、1つ、又は、他のクランプ部分が複製型RNAから解離するようにして親和性分子部分が十分な安定性をもつて結合するような何物かと、（それは本質的に検体だけであろう）遭遇すれば、RNAはとたんに複製可能になり検出可能な形をとる。本発明のスマート・プローブの具体例の利用に際して、まず初めに、サンプルの核酸とのハイブリダイゼーションを行い、次に、短い洗浄を行なつて結合していないスマート・プローブを除き、さらに、一方又は両方のクランプ部分が複製型RNAから遊離している。少量の非特異的な結合をしたスマート・プローブを減少させ、最後に、ジチオスレイトールでジスルフィド結合を開裂して複製型RNAを親和性分子から解離させた後、随意に、RNAを複製させ、複製したRNAを検出することにより検出を行うのである。

検体を含まない部位に非特異的に結合した複製型RNAから生じるシグナルは、本発明に従うスマートプローブを用いると減少してしまうので、比較的低いバック・グ

ラウンドを得るためのハイブリダイゼーションの後での長時間の洗浄の必要性は、技術分野において現在行われている典型的な核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アッセイに比べて、そのようなプローブを用いたアッセイでは小さなものとなる。

イムノアッセイや核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アッセイの技術に習熟した者には理解できることだが、“バック・グラウンド”を生じる、親和性分子や複製型RNAの（そのRNA部分あるいは一番目の連結残基部分を介しての）不可避的な“非特異的結合”を取り除き、ただ検体に（親和性分子に結合したり又は結合しつづけて）連結した複製型RNAだけがアッセイ系に存在するように、必要な結合をおこさせ、洗浄のステップを行った後で、系をRNA依存性のRNAポリメラーゼを用いる複製からなるプロセスにより、複製型RNAが検出可能になる条件にかけるのである。

現在の発明に従つてアッセイを行う上で、アッセイ中の検体に結合する又は結合している親和性分子に結合した複製型RNAは、親和性分子に結合している間か、あるいは、それから分離された後のどちらかにRNA依存性RNAポリメラーゼにより複製されることが必要である。複製型RNAを親和性分子から分離させる各種の方法を先に記述したがその中には、複製型RNAを親和性分子に結合させている連結部分の中の、又は、間のジスルフィド結合を還元的に切断する方法が含まれている。

複製型RNAをRNA依存性RNAポリメラーゼで複製する方法は、技術分野において知られている。一般に、RNAは、4つのリボヌクレオシド-5'-三リン酸、ATP、CTP、GTP及びUTPを含む適当な水系緩衝液中、単に酵素と混合し、適当な温度でインキュベートしなければならない。例では、好まれる酵素であるQ $\beta$ レプリカーゼを用いて複製を行う条件を説明している。Kramerら、M.Mol. Biol. 89巻、719-736ページ（1974年）；Kramerら米国特許出願広報No. 614,350；Mielら（1983年）先に引用、なども参照せよ。

別法として、親和性分子から解離した複製型RNAは、ECTEOLAペーパーのような、正に荷電した担体に結合させることができる（Sarisら、NucL. Acids. Res. 10巻、4831-4843ページ（1982年））。複製型RNAの結合したそのような担体は、適当な緩衝液を用いて4つのリボヌクレオシド-5'-三リン酸とともに適当な温度のもと、RNALレプリカーゼ（RNR依存性RNAポリメラーゼ）の溶液に懸濁させると（即ち液相の複製に用いたのと本質的に同じ条件である）、すると担体に結合したRNAの複製が起きるのである。Sarisら（1982年）上述；及びBresserら、Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 80巻、6523-6527ページ（1983年）を参照せよ。簡便なRNAの検出では、複製型RNAは正に荷電した担体に結合したままである。

複製型RNAは多くの異なる方法により検出することができる。

検出は、例えば、接触光プリンティング法 (Kutateladzeら, Anal. Biochem. 100巻、129-135ページ (1979年)) のように複製型RNAの紫外線吸収により行うことができる。

複製されたRNAが放射活性をもつように、複製反応中、放射活性で標識した (例えば、 $^3\text{H}$ ラベルとか、 $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ラベルなど) リボヌクレオシド-5'-三リン酸を用いることにより、複製されたRNAをその放射活性により多くの既知の方法のいずれかを用いて検出することができる。

ピオチン又はイミノピオチンは複製型RNAにとりこませることができる、これはさらに既知の技術を用いて、RNAの結合したピオチンに結合し、簡単に検出することのできる色素の生成を触媒する、酵素-アビジン又は酵素-ストレプトアビジン付加物として検出することができる。Matthewsら (1985年) 上述; Learyら (1983年)、上述; Wardら、上述; Englehardtら、上述、を参照せよ。ピオチン又はイミノピオチンの複製型RNAへのとりこみは、ウラシル残基の5位の炭素にスパーサーを介してピオチニル化されたUTPを、複製反応のレプリカーゼの基質として用いることにより行うことができる。そのようなUTPは既知の化合物である。さらに、そのようなUTPはQ $\beta$ レプリカーゼの基質となり、さらに、5位の炭素に結合したスパーサー・グループを介してピオチニル化されたウラシルを含むRNAは、その合成にそのようなUTPを用いたために、Q $\beta$ レプリカーゼが触媒する複製の鑄型となることが知られている。

複製の過程の結果生じたRNAもまた、Forsterら (1985年) 上述、の方法に従い、光ピオチン酢酸を用いてピオチニル化することができ、さらに次に、アビジン-酵素付加物-色素原化合物の系を用いて、複製反応においてピオチニル化したUTPを使つて合成した複製型RNAと同様に検出することができる。

複製過程の結果生じたRNAは、T4RNAリガーゼの触媒する反応を用いて、複製型RNAの3'末端に蛍光修飾した核酸を付加することにより、蛍光をもたせることができる。Cosstickら, Nucl. Acid. Res. 12巻、1791-1810ページ (1984年) を参照せよ。その結果得られたRNAの蛍光は、いつかの標準的な技術のいずれかにより、RNAの検出に用いることができる。

複製されたRNAの検出に用いることのできるさらに他の方法の中には、核酸と特異的に結合する受容体物質を、複製が行なわれる系か、あるいは、複製型RNAが単離されているECTEOAペーパーのような正に荷電した担体などの媒体に添加して、受容体物質から生じるシグナルを測定するものがある。そのような物質には以下のものが含まれる: "ステイン・オール (Stains all)" のような色素原染料 (Dahlbergら, J. Mol. Biol. 41巻、139-147ページ (1969年)); メチレンブルー (Dingman & Peacock, Biochemistry, 7巻、659-668ページ (1968年) 及

び銀染色 (Sammonsら, Electrophoresis, 2巻、135-141ページ (1981年)、Igloi, Anal. Biochem. 134巻、184-188ページ (1983年)); 例えば臭化エチジウムなどのRNAに結合する蛍光原化合物 (Sharpら, Biochemistry, 12巻、3055-3063ページ (1973年)); Bailey & Davidson, Anal. Biochem. 70巻、75-85ページ (1976年); Q $\beta$ レプリカーゼによる複製の鑄型となるRNAに特異的に結合する蛍光原化合物……例えばQ $\beta$ レプリカーゼの感染サブ・ユニットに共役するフィコビリ・プロテイン (phycobiliprotein) (Oiら, J. Cell Biol. 93巻、981-986ページ (1982年)、Stryerら、米国特許No. 4,520,110) などである。

レプリカーゼの濃度が、鑄型RNAの濃度よりも濃いままであり、さらにリボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けないと仮定すると、鑄型RNAの濃度は、レプリカーゼの触媒によるRNAの複製の間、時間とともに対数的に増大するであろう。鑄型RNAの濃度が、レプリカーゼの濃度と等しくなるか、超えてしまった後では、リボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けないかぎり、鑄型RNAの濃度は、時間に直線的に増加するであろう。例えばKramerら (1974年) 上述、を参照せよ。

実施例Iに特定されるレプリカーゼ触媒による複製の条件下では、MDV-1 RNAは36秒毎にその濃度を倍化し、ついには、鑄型の濃度が酵素の濃度を上回ってしまうことが示されている。

レプリカーゼ触媒による複製反応系で、一定の反応時間の後の鑄型RNAの濃度は、鑄型RNAの初期濃度に関係することになる。もし、複製反応の間中、レプリカーゼの濃度が鑄型の濃度よりも高いものと仮定すれば、(さらにリボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けなければ)、反応終了時の鑄型RNAの濃度の対数は、鑄型の初期濃度 (反応開始時点の) 対数に、直接比例するであろう。レプリカーゼの濃度が鑄型の濃度よりも低くなつた後では、リボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けないかぎり、反応終了時の鑄型の濃度は、鑄型の初期濃度の対数に直接比例する。さらに、鑄型の濃度がレプリカーゼの濃度に等しくなるまでに要する反応時間は、鑄型の初期濃度の負の対数に比例する。

複製反応をより長時間進行させることにより、さらに大きな感度を得ることができる。

本発明に従うアツセイでは、検体を試験しているサンプルとコントロールサンプルの双方のテストサンプルについてできるだけ同じような条件下で同時にアツセイを行うのである。技術分野において理解されているように、コントロールサンプルは、検体を含まないか、あるいは既知の量の検体を含む点以外はテスト・サンプルと同様なものになるようにする。検体を含まないコントロールは "バック・グラウンド" であり、それ以下のときは、検体を含むサンプルと含まないサンプルとを区別す

ることは不可能である。テスト・サンプルのアッセイで複製された複製型RNAの量又は濃度を、同時にアッセイしたコントロール・サンプルの量又は濃度と比較することにより、テストサンプル中の検体の存在をバック・グラウンド以上のレベルで決定することができるのである。もし、既知の濃度範囲の検体を加えたコントロール・サンプルを用いたときは、テスト・サンプル中の検体の濃度を推測することができる。

ここで、本発明を実施例によりさらに詳細にわたって記述してみる。

#### 実施例1

本実施例はピオチン及びアビジン（次に）の中間変種RNA（「MDV-1」RNAとする）への結合において、該RNAがQβRNAポリメラーゼに対する鋳型として活性を保持し、ピオチンまたはピオチン+アビジンから分離可能である、同方法を示す。ピオチン-アビジン特異的結合ペアを介してアビジンに特異的に結合する能力のために、ピオチンのみが付いたMDV-1 RNAはアビジン骨格が結合されうる（例えば、該親和性分子に直接自身で結合されるピオチンを介して）いずれの親和性分子に対しても普遍的レポーターとなり、その際、親和性分子の標的的生物ポリマー検体に特異的に結合する能力は損わない。ピオチンに特異的に結合する能力（ピオチンとアビジンとの間の特異的結合ペアに由来する）のために、ピオチン及びアビジン（ピオチンに対して複合体形成したもの）を結合したMDV-1 RNAが、ピオチン骨格が結合されうるいずれの親和性分子に対しても普遍的レポーターとして使用されうるが、その際該ピオチン骨格自身のアビジンに特異的に結合する能力または該親和性分子の標的的生物ポリマー検体に特異的に結合する能力は損わない。（アビジンは4つのピオチン-反応生部位を有しており、それ故ピオチン-アビジン-ピオチン結合という中間組成物となりうる。）

MDV-1 RNAはミール（Miele）ら、J.Mol.Biol.171巻、281-295ページ（1983年）において示される、中間変種RNA変異株と同じ配列を有しており、次の相違点がある。ミールらの配列の43位CがMDV-1 RNAにおいてUに変えられる。ミールらの配列の61位AがMDV-1 RNAにおいてGに変えられる。ミールらの配列における105位AがMDV-1 RNAにおいてUに変えられる。ミールらの配列の134位CがMDV-1 RNAにおいてUに変えられる。最後に、ミールらの配列における135位GがMDV-1 RNA配列においてAに変えられる。今述べられた配列をもつ特定のRNA変異株は本明細書の本実施例及び他の実施例に

おいて使用されたが、本変異株は、単に供給面で簡便に入手可能であるという理由から使用された。該Qβレプリカーゼによる試験管内での複製に対する鋳型となるいくつかのRNA（「野生型」中間変種RNA、MDV-1 RNAとは異なる中間変種RNAの変異株、ミニ変種RNA、マイクロ変種RNA、ナノ変種RNAのひとつ、同定はされているが名前がまだ決定されていない他の変種または上記いずれかの突然変異株で試験管内で該Qβレプリカーゼによる複製をうける能力を保持しているものを含む）もまた使用される。

さらに、QβRNA-依存性RNAポリメラーゼは、その試験管内における著しい安定性のために本発明に対する好適なレプリカーゼであるが、使用されうる技術において知られている他のRNA-依存性RNAポリメラーゼがあり、これは同ポリメラーゼが複製に対する鋳型として認識する複製可能RNAとともに非常に数が多い。これら他の酵素の中にはSPレプリカーゼ及びMS2レプリカーゼが含まれる。

Qβレプリカーゼを用いる酵素的合成により得られる5'-...MDV-1(+) RNAは一連の工程；

1) 5'-末端3リン酸基は子ウシ腸アルカルフオスファターゼとのインキュベーションにより除去され、〔ガンマ-<sup>32</sup>P〕ATP及びT4ポリヌクレオチド・キナーゼとのインキュベーションにより5'-末端1リン酸に換えられた；

2) 5'-フオスフォロイミダゾール基がカツプリング試薬、1-エチル-3-〔3-ジメチルアミノプロピル〕カルボジイミドの存在下イミダゾールとの縮合により合成された；

3) 該イミダゾール基はシスタミン・ジヒドロクロリドとのインキュベーションによりシスタミン基に転換された；

4) ピオチンがピオチニル化試薬、N-ヒドロキシサクシニミドピオチンとのインキュベーションによりシスタミンに結合された；そして

5) アビジンがアビジンとのインキュベーションにより5'-ピオチン基に結合された

により5'-ピオチニル化MDV-1(+) RNA-アビジン付加物に転化された。また、6) 該5'-ピオチニル化MDV-1 RNA-アビジン付加物は部分反応した中間体からアクリルアミドゲル電気泳動により分離された。次の反応式の初めの4工程は上述の工程2)～5)を要約する；

10

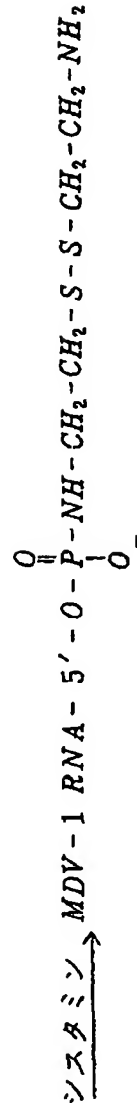
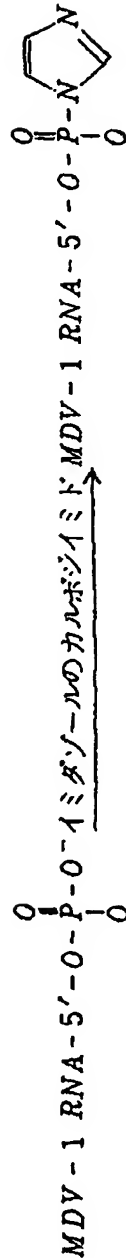
20

30

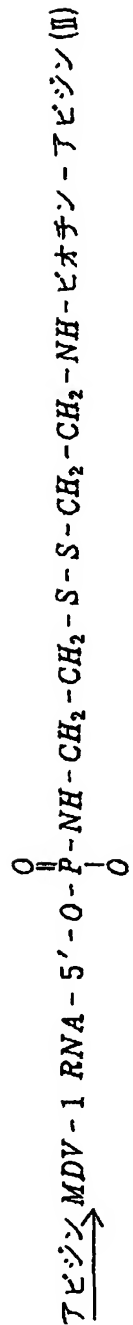
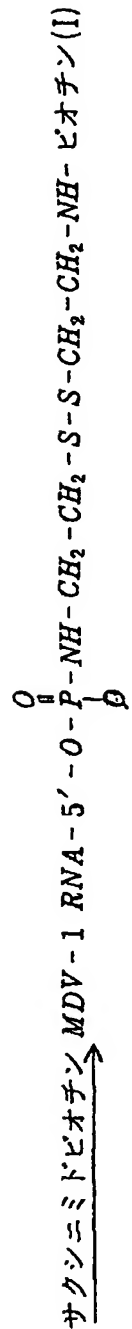
40



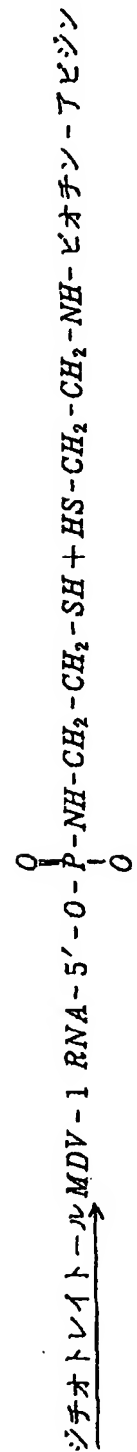
29



(15)



30



式に示される5番目の工程は以下で述べるようにピオチン-アピジンからRNAを分離するための、シスタミン骨格のジスルフィドの還元的開裂を示す。

RNA-ピオチン-アピジン付加物 (II) の電気泳動上での移動度は、その大きさのため、5'-ピオチニル化 50

RNA前駆体 (I) の移動度よりも低かった。

形成したRNA-ピオチン-アピジン付加物の量 (各ゲルのバンド中の放射活性を測定することにより決定される) はアピジン濃度の関数として漸近的に増加し、形成付加物25~35%で最大値に対した。RNA-ピオチン-ア

ビジン付加物 (II) の同定は3つの方法で確かめられた:

1) 該5'-シスタミンMDV-1 RNAがアビジンとインキュベートされ、生成物の電気泳動上の移動度が、未反応対照のそれと同定され、遅い移動バンド中の付加物は非ビオチニル化前駆体でないことを示した;

2) 同様に、該5'-リン酸化MDV-1 RNAがビオチニル化試薬と反応、電気泳動による精製、アビジンとのインキュベートのそれぞれがなされ、その移動度が同一のままであつた;そして

3) 遅い移動度のバンドから溶出される該付加物の80%以上がビオチニル化アガロースに結合していたが、5'-シスタミンを含む対照物の場合では10%以下であつた。

さらに詳細な記述として、ビオチン及びアビジンのMDV-1 (+) RNAの5'-末端への結合及び該付加物の同定が、材料を使い、次の方法に従つて行われた:

#### 酵素及び化合物

次のものが購入された: 子牛腸アルカリフوسفターゼ (ボーリンガー・マンハイムバイオケミカルス、インディアンポリス、インディアナ州、米国)、バクテリオファージT4ポリヌクレオチドキナーゼ (ファルマシアP-Lバイオケミカルス、ピスキヤタウェイ、ニュージャージー州、米国); リボヌクレアーゼT1及び高重合酵母RNA (キヤルバイオケム・ベベリング、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国); N-ヒドロキシサクシニミドビオチン (シグマケイカル社、セント・ルイス、ミズーリ州、米国); 2,2'-ジチオビス (エチルアミン)-ジヒドロクロライド (CTCオーガニックス、アトランタ、ジョージア州、米国); 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (アルドリッチ・ケミカル社、ミルウォーキー、ウイスコンシン州、米国); ビオチン化アガロース (8mgアビジン/ml結合) 及びアビジンDN (ベクター、ラボラトリース、バーリントン、カリフォルニア州、米国); 及び【ガンマー-<sup>32</sup>P】ATP及び【アルファ-<sup>32</sup>P】GTP (アマーシヤム、アーリントン・ハイツ・イリノイ州、米国)。Qβ RNAレプリカーゼは、ヨーヤング (Eoyang) 及びホガスト (August) (文献、ヨーヤングら、(1971年)、Nucleic Acid Research, G.L. カントニ (Cantoni) 及びD.R. デーヴィース (Davies) の編集による (ハーバー・アンド・ロー、ニューヨーク)、第2巻、829~839ページ中の操作) の操作により、バクテリオファージQβ感染大腸菌株Q13から単離され、該ヒドロキシバタイトの工程は省かれた。

#### MDV-1 (+) RNAの調整

容易に同定及び単離が可能な (クラマー (Kramer) ら、J. Mol. Biol. 89巻、719-736ページ、974年参照) 中間変種RNAの変異株が実施例において使用され、ここでは「MDV-1 RNA」として言及される。この配列は前述さ

れる。758μgのMDV-1 RNAは、705ngのMDV-1 (+) RNA変異株鑄型及び69μgのQβレプリカーゼを、210分間、37°Cで1mM ATP、1mM CTP、1mM GTP、1mM UTP、15mM MgCl<sub>2</sub>、100mM トリス-HClを含有する1ml中、pH7.5でインキュベートすることにより合成された。該インキュベーション混合物は次にフェノールによる抽出 (メソツズ・イン・エンザイモロジー、L. グロスマン (Grossman) 及びK. モルデイブ (Moldave) による編集 (アカデミックス・プレス、ニューヨーク)、12巻、パートB、87-100ページ、1968年におけるK.S. カービー (Kirby) ) により脱タンパクされ、該RNAは、2M酢酸アンモニウム存在下-20°Cで2倍量のエタノールを用いる沈澱により単離された。MDV-1 (+) RNAはMDV-1 (-) RNAから、1mM MgCl<sub>2</sub>存在下アクリルアミドゲル電気泳動により分離された (D.R. ミルズ (mills) ら、セル、15巻、541-560ページ、1978年)。

#### 化学修飾RNAの分析及び単離

RNA中間体は、100mM NaCl、1mM EDTA、10mMヘベス (pH7.5) (T. マニアティス (maniatitis) ら、Molecular Cloning: ラボラトリ・マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1982年) で平衡化させたセファデックスG-50 (ファルマシア P-L バイオケミカルズ) を通ず、スピン・カラム・クロマトグラフィーによつて反応混合物から単離された。RNAは100mM NaCl存在下、-20°Cで2倍量のエタノール添加により、溶液から沈澱された。電気泳動は、90mM トリス-ホウ酸、pH8.3、1mM EDTA中で添加・展開される、厚さ1mmの6%ポリアクリルアミド・ゲル上で行われた。変性ゲルはまた、7Mの尿素を含有した。変性ゲル上での電気泳動前に、RNAは7M尿素中90°Cで1分間加熱により融解され、ただちに冷却された。ゲルのオートラジオグラフは、デュボン・クロネックス・ライトニング・プラス (Dupont Cronex Lightning Plus) 強化スクリーン存在 (あるいは非存在) 下、-80°CでコダックX-オマツトARフィルムに露出することにより得られた。RNAは500mM酢酸アンモニウム、pH7.5、1mM EDTA (T. マニアティスら、前述) により、ゲルから溶出された。

#### 5'-末端MDV-1 (+) RNAの脱リン酸化

該5'-末端トリフオスフェートグループは2μgのMDV-1 (+) RNAから、0.7EU子牛腸アルカリフوسفターゼと30分間、50°Cで、50μlの50mM トリス-HCl、pH8、100μM EDTA中でインキュベートすることにより除去された。さらに0.7EU子牛腸アルカリフوسفターゼが加えられ、該インキュベーションはさらに30分間継続された。該反応は、該インキュベーション混合物を100mM NaCl及び2%ドデシル硫酸ナトリウム中に空け、これを15分間60°Cで加熱することにより停止された。該溶液は次にフェノール:クロロホルム (1:1) で2度、クロロホルムで2度 (T. マニアティスら、前述)

抽出することにより、脱タンパクされた。該脱リン酸化MDV-1 RNAは次にエタノールによる沈澱により単離された。

MDV-1 RNAの5' -<sup>32</sup>Pリン酸化

2 μgの脱リン酸化MDV-1 RNAは3分間、50°Cで、10 mM トリス-HCl 20 μl (pH7.5)、1 mM スベルミジン、100 μM EDTA中でインキュベートされ、次いで、迅速に冷却された。該容量は次に12.2 p molの〔ガンマー-<sup>32</sup>P〕ATP (300 Ci/mol)、30 EU T4ポリヌクレオチド・キナーゼ及び、最終濃度でMgCl<sub>2</sub> 10 mM、ジチオトレイトール 1 mM、トリス-HCl 50 mM (pH7.5) になる緩衝液を用いて40 μlとされた。この溶液は75分間37°Cでインキュベートされ該混合物を20 mM EDTAに空けることにより停止された。該キナーゼは同量のフェノール：クロロホルム (1:1) で抽出され、該リン酸化MDV-1 RNAはエタノールを用いる沈澱により単離された。該RNAは、セファデックスG-50を通すスピン・カラム・クロマトグラフィー、それに続くエタノールによる再沈澱によつてさらに精製され、次いで1 mM EDTA-NaOH (pH8) 中に懸濁化された。MDV-1 RNAの5' -シスタミン-MDV-1 RNAへの転化

2 μgの〔5' -<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA及び16 μgの高重合酵母RNA (180 μgの酵母RNAと50 EUの子牛腸アルカリフオスファターゼと1時間50°Cでインキュベートすることにより前もつて脱リン酸化されたもの) が3分間、50°Cで20 μlの1 mM EDTA-NaOH (pH8) 中でインキュベートされ、次いでただちに冷却された。25 μlの1 M イミダゾール (pH6) 及び2.5 μlの1.5 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドが次に加えられ、該混合物は1時間23°Cでインキュベートされた。RNAはこの混合物から、セファデックスG-50を通すスピン・カラムクロマトグラフィーにより単離された。

〔5' -<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAの5' -イミダゾライド (非転化〔5' -<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAを含む) は100 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mM ヘベス (pH7.5) 100 μl 中で集められた。1 M, 2' -ジチオビス (エチラミン) -ジヒドロクロライド (シスタミン・ジヒドロクロライド、pH7.7) が次に加えられ、最終濃度25 mMとされ、該溶液は1時間50°Cでインキュベートされた。該RNAは次にセファデックスG-50を通すスピン・カラムクロマトグラフィーにより単離され、エタノールを用いて沈澱された。

5' -シスタミン-MDV-1 RNAの5' -ビオチン化シスタミン-MDV-1 RNAへの転化

該5' -シスタミン-〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA (非転化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAを含む) は200 mM ヘベス (pH7.7)、1 mM EDTA 40 μl に溶解され、40分間、23°Cでインキュベートされた。過剰のN-ヒドロキシサキシニミドビオチンは遠心分離により除去され、該RNAは次にエタノールを用いて沈澱された。該5' -ビオチン化MDV-1 RNA (I) (非ビオチン化RNAを含む) は変性ゲル上での電気泳動により過剰のN-ヒドロキシサキシニミドビオチン

ンからさらに分離された。該<sup>32</sup>P-標識バンド中のRNAは該ゲルから溶出されエタノールを用いる数回の沈澱により精製された。

5' -ビオチン化MDV-1 RNAの非ビオチン化MDV-1 RNAからの分離

50から200 μgの部分5' -ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAは2から10 μgのアビジンDN (ベクター・ラボラトリ、バーリングゲーム、カリフォルニア州、米国から購入されたアビジンの高純度型) と45分間、23°Cで10 mM ヘベス (pH7.7)、1 mM EDTA中でインキュベートされた。該5' -ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-アビジン付加物 (II) は、非ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕RNA及び遊離アビジンから、変性ゲル上の電気泳動により分離された。該5' -ビオチン化MDV-1 RNA-アビジン付加物は次に該ゲルから抽出され、エタノールを用いて沈澱された。該RNA-ビオチン付加物 (II) のビオチン化アガロースとの複合体形成による同定

5' -ビオチン化された〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-アビジン付加物及び5' -シスタミン-〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAは該ゲルから流出され、エタノールを用いて数回沈澱された。各付加物はビオチン化アガロール 50 μl と15分間23°C、10 mM ヘベス; pH7、1 mM EDTA中でインキュベートされた。該アガロースは遠心分離により沈澱され、緩衝液を用いて2度洗浄された。該ビオチン化アガロースにより沈澱された、各放射活性付加物のフラクションはシンチレーション・カウンターで測定された。

5' -チオ-エチルアミノ-MDV-1 RNA

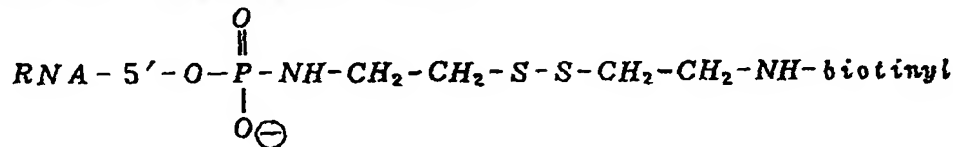
該〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-ビオチン-アビジン付加物はジチオトレイトールを用いる還元により、5' -チオ-エチルアミノ-〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA及びビオチン-アビジン副産物に転化された。5' -ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-アビジン付加物は、1時間、23°C、100 mM ジチオトレイトール (DTT) 30 μl、1 mM EDTA、10 mM ヘベス (pH7.7) 中でインキュベートされ、該スベーター結合アームのジスルフィド結合を切断する。次にビオチン化アガロール 40 μl が該反応混合物に加えられ、1時間23°Cでインキュベートし、ビオチン-アビジン副産物を結合する。該ビオチン化アガロースは遠心分離によつて該溶液から除去された。

放射活性の95%は上清液から回収され、ジスルフィド結合アームが切断されたことを確認する。非還元RNA-ビオチン-アビジン付加物がビオチン化アガロースとインキュベートされる対照反応においては、10%に満たない放射活性が上清液中に見い出された。

切断されたRNAはエタノールを用いる沈澱により回収され、100 μM ジチオトレイトール (還元RNAの二量化を防ぐ) の存在下、非変性ゲル上の電気泳動により分析された。該5' -チオ-エチルアミノ-MDV-1 RNAは、5' -リン酸化MDV-1 対照RNAと同じ速度でゲル上を移動したが、非還元付加物はより遅い速度で移動した。該

5'-ビオチニル化MDV-1 RNA-アビジン付加物 (II) 及び該5'-チオ-エチルアミノ-MDV-1 RNAはそれぞれ、QβレプリカーゼによるMDV-1 RNA合成に対する鋳型として作用することが可能かどうかをみるために試験された。

試験されるべき、該修飾 [<sup>32</sup>P] MDV-1 RNA各5 μg は、37°Cで、50 μg の400 μM ATP、400 μM CTP、400 μM [アルファ-<sup>32</sup>P] GTP (500m Ci/m mol)、400 μM UTP 12mM MgCl<sub>2</sub>、84mM トリス-HCl (pH7.5) 中でインキュベートされた。2 μl の試料が、7分~15分の間毎分とられた。各試料はナンバード・セミサークル (孔径23mm) の3MM<sup>®</sup> 濾紙 (ワットマン) 上に吸着され、氷冷300mMリン酸、20mMピロリン酸ナトリウム、1mM EDTAを含むピーカー中に空けられた。該濾紙は同液を用いて6回洗\*



に示される、ビオチンの結合位置及びスペーサー・アームの長さに帰せらる。RNA合成は該鋳型の非修飾3'末端 (A.K.バナージー (Banerjee) ら、J.Mol.Biol.46巻、445-455ページ、1969年) で開始し、該スペーサー・アームは該鋳型の5'末端での複製停止のために適当な長さ以上与えなければならない。

#### 実施例II

ヒト・ガンマ・グロブリン (IgG) は、A) 風疹に最近感染した被験者及びB) 風疹に感染していない被験者から単離され、その抗血清が前もって風疹抗原との反応に陰性であることが試験された。各試料中のIgGをビオチンに結合させるために、各試料はホウ酸緩衝生理食塩水 (pH8.5) 中で4mg蛋白/mlに希釈される。ジメチルホルムアミド (10mg/ml) 中に溶解した。ビオチニル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル50マイクロリットルが該希釈試料1mlごとに加えられる。該反応混合物は室温で2時間攪拌され、次いで、1ml当たりリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4, 4°C) 1リットルに対して一晚透析される。結果としてできる溶液は、ビオチニル化IgGを含有し、4°Cでアジ化ナトリウム存在下保存される。

0.1M炭酸ナトリウム緩衝液中、pH9.8で風疹抗原で被覆されたウェルを有する。ポリスチレン・マイクロタイタープレートが、3時間室温でウェル当たり、1:10、1:30、1:100、1:300、1:1000、及び1:3000の希釈比で、上述のように調製されたビオチニル化IgG含有溶液50 μlとともにインキュベートされる。風疹抗原で被覆されないウェルをもつプレートが対照として使用される。IgG試料の希釈はPBS中で5%ウマ血清が用いられた。ビオチニル化IgG試料の希釈液とのインキュベーション後、該プレートはNaCl-トウイーン20を用いて3回洗浄される。

\* 浄され、ファイバー中にトラップされた沈澱RNAから標識前駆体を流出した。該濾紙は次にエタノールを用いて1回洗浄、空気中で乾燥され、その放射活性はシンチレーションカウンター中で測定された。結果は両5'-修飾RNAがQβ RNAレプリカーゼに対する鋳型として作用することを示した。各反応におけるRNA合成速度は、100ng/ml非修飾MDV-1 RNAを用いて開始した対照反応においてみられる合成速度と同じであつた。

本実施例は、ビオチンのMDV-1 RNAへの結合に含まれる化学的操作もアビジンの5'末端ビオチン基への場合も該RNA配列の酵素的複製に阻害を与えないことを示す。該5'-末端ビオチン-アビジンが該RNAの酵素的複製に阻害を与えない、という事は次図:

マイクロタイタープレートの各ウェルに、次いで実施例Iの場合のように調製されたMDV-1 ビオチン-アビジン付加物 (II) のPBS溶液が、1~10 μg/mlの濃度で加えられ、該ウェルは次に該溶液とともに2時間室温でインキュベートされる。次に該プレートはNaCl-トウイーン20を用いて3回洗浄される。

次にトリス緩衝液 (pH7.5) 中の0.1M DTTが全てのウェルに加えられ、結果としてできる混合物は室温で1時間インキュベートされる。

各ウェルは次にQβレプリカーゼ4.6 μgとともに、37°C、400 μM ATP、400 μM CTP、400 μM [アルファ-<sup>32</sup>P] GTP (500m Ci/m mol)、400 μM UTP、12mM MgCl<sub>2</sub>、84 mM トリス-HCl (pH7.5) 50 μl 中でインキュベートされる。2 μl の試料が1分から15分の間、毎分とられる。各2 μl の試料はナンバード・セミサークル (孔径23mm) の3MM<sup>®</sup> 濾紙 (ワットマン) 上に吸着され、氷冷300mMリン酸、20mMピロリン酸ナトリウム、1mM EDTAを含むピーカー中に空けられる。該濾紙は同液を用いて6回洗浄され、ファイバー中にトラップされた沈澱RNAから標識前駆体を流出する。該濾紙は次にエタノールを用いて1回洗浄、空気中で乾燥され、その放射活性はシンチレーションカウンター中で測定される。バックグラウンド以上の放射活性は検定血清中の抗-風疹IgGの存在を示唆するものである。

#### 実施例III

5'-ビオチン-ヘクス-P-16-mer (5'-biotin-hex-P-16-mer) は、ヘキサメチレンジアミンリンカーを介し16-マー5'-CACAATTCACACAAC-3'に結合したビオチンから成り、ML3mp 8DNA断片と相補的配列をもつたもので、B.C.F.チュー (Chu) 及びL.E.オーゲル (Orgel)、DNA4、327-331ページ (1985年) に

従つて調製される。また、本参考文献に従つて、単一株のM13mp8DNAを10ng、0.1ng、0.01ng及び0.001ng含有するニトロセルロース・ブロットが調製され、DNAを含有しない対照ブロットも同様に調製される。

該ブロットは切断され、実施例Iの場合のように調製されたMDV-1 ビオチン-アビジン付加物大過剰と反応する、マイクロタイターウェルに移される(ウェル当り50 $\mu$ l、付加物濃度はPBS中約1 $\sim$ 約10 $\mu$ g/mlである)。各該ブロットは次にNaCl-トウイーン20で充分洗浄され、新たなマイクロタイターウェルへ移行、初めにトリス緩衝液(pH7.5)中0.1M DTTと1時間インキュベート、次いで先の実施例IIにおいて記述されたQ $\beta$ レプリカーゼ含有溶液50 $\mu$ l(ウェル当たり)とインキュベートされる。2 $\mu$ lの試料が1分 $\sim$ 30分の間、90秒ごとにとられ、シンチレーションカウンター中での放射活性測定のために実施例IIで記述されるように濾過紙上にブロットされる。バックグラウンド以上の放射活性は該検定ブロット上のM13mp8DNAを示唆するものである。

#### 実施例IV

本実施例は、ブロットがDTTとともにインキュベートされないことを除いて、実施例IIIと同方法で行われ、結果として、MDV-1 RNAをビオチン-アビジンに結合するジスルフィド結合は切断されず、該MDV-1 RNAは16-merプローブ(及びM13mp8検体)への結合を残している。しかしながら、該ブロットはQ $\beta$ レプリカーゼ溶液とインキュベートされ、試料がとられ、実施例IIIで記述されたように放射活性が測定される。

#### 実施例V

本実施例は、DTTとのインキュベーションの代わりにトリス緩衝液(pH7.5が該ウェルに加えられ、該マイクロタイターが80 $^{\circ}$ C10分間加熱され、ニトロセルロース・ブロットM13mp8検体からMDV-1 RNAレポーター基に結合したブロットを遊離させることを除いて実施例IIIと同方法で行われる。室温に冷却後、該試料はQ $\beta$ レプリカーゼ溶液とインキュベートされ、そうでなければ実施例IVの場合のように処理される。

#### 実施例VI

実施例III $\sim$ Vで記述される16-merオリゴヌクレオチドプローブは、フォスター(Forster)ら、Nucleic Acids Res. 3巻、745 $\sim$ 761ページ(1985年)によつて記述されるように酢酸フオトビオチンを用いる光化学反応においてビオチニル化される。該ビオチニル化オリゴヌクレオチドはRPC-5を用いる高性能液体クロマトグラフィーによつて出発物質から分離される。該ビオチニル化16-merは次に実施例IIIの操作に従つてM13mp8 DNAの同定に供される。

#### 実施例VII

M13mp8 DNAの300塩基断片がファージから得られ、ビオチンを用いて化学的に標識されるが、これは上記フォスターらの操作に従つて酢酸フオトビオチンを使用す

る。上記フォスターらによつて記述される。ドット・ブロット交配の操作が流用される。次に該ブロットは実施例IIIにおいて記述されるようにビオチン-アビジンレポーター付加物とインキュベートされ、実施例IIIの操作の残りはM13mp8 DNAを同定するために流用される。実施例VIII

炭素5位へのスパーサーアームを通してビオチニル化された、ウリジン残基が上記ランガー(Langer)ら及び上記ラリー(Leary)らによつて記述されるニック-翻訳の操作により、実施例IIIにおいて記述されるオリゴヌクレオチド中に導入される。次に結果としてビオチニル化される16-merについて、MDV-1 ビオチン-アビジンレポーター付加物を用いる実施例IIIの操作に従い、ブロットM13mp8DNAに対する検定が行われる。

#### 実施例IX

本実施例は核酸検体に対する「セルフ・レポーターング(自己報告)」親和性分子、すなわち本発明に従う検定系においてRNA自体の同定のための複製型RNAでもある親和性分子としての組換えRNAの使用を示す。

本実施例はまた、同定性を供する複製レポーターグループRNAのビオチニル化を示す。

ミール(Miele)ら(1983年、上記)及びクラマー(Kramer)らの米国特許出願第614,350号(上記)の操作に従い、30-merオリゴヌクレオチド5'-AGUCAGGCACCGU GUAUGAUAUCUAACAAU-3'のついたMDV-1 RNA(MDV-1配列の63位Gと64位Uとの間に挿入されたもの)から成る、組換えRNAが調製される。該30-merはプラスミッドpBR322断片の配列と相補的なそれを有する(マニアティスら、上記の付録Bにおいて提供されるpBR322配列中の71 $\sim$ 100位をみよ。)

マシユーズ(Matthews)らのAnal. Biochem. 151巻、205 $\sim$ 209ページ(1985年)の操作に従い、ニトロセルロースの仲介により該組換えRNAはpBR322DNA2ng $\sim$ 0.01pgを含有するブロットにハイブリッド形成される。組換えRNA5ngが各ハイブリッド形成に使用される。該組換えRNAは煮沸により変性させられ、つづいてハイブリッド形成溶液(45%ホルムアミド、20mMリン酸ナトリウム、5 $\times$ SSC、0.1%フィコール400、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、250mg/ml変性サケ精子DNA、pH6.4)に加えられる。該ハイブリッド形成は次に12時間42 $^{\circ}$ Cで行われる。

該ハイブリッド形成及びハイブリッド形成後の洗浄に続いて、該試料に対応する個々のサークルはブロットから切除、別個に処理され、トリス緩衝液(pH7.5)に空けられる。そして該サークルは10分間、100 $^{\circ}$ Cに加熱され、ハイブリッド組換えRNAを溶液中に分離する。ウェル中の溶液は室温まで冷却された後、放射活性標識GTPが非放射活性GTPに換わり、非標識UTPがビオチニル化GTP(ビオチン-11-UTPがベセスダ(Bethesda)リサーチ・ラボラトリー、ガイゼルスブルク、メリーランド州、

米国から購入される；本品は11-アトム・スベサー・アームを介してウラシル骨格の炭素5位にビオチンが結合したUTPである、ランガーら、上記、をみよ；ワード（Ward）ら、欧州公報第0063879号）に換わっている、ことを除いて実施例IIにおいて記述されているものと同じQβレプリカーゼ溶液50μlが各ウェルに加えられ、該プレートは37℃でインキュベートされる。30分間90秒ごとに、96-指アリコツターを使用し、各ウェルから溶液2μlがニトロセルロースフィルター上にプロットされ（フィルター上にマークされた、各ウェルに対応するエリアをもつ）、各フィルターは、マシユーズらの操作に従い化学蛍光試薬（1.25mMレミノール、2.7mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.1M トリス緩衝液、pH8.6、増強剤として0.136M p-ヨードフェノールまたは0.68μM p-ヒドロキシケイ皮酸を共存）存在下ストレプトアビジン-パーオキシダーゼ複合体とともに展開される。スポットからフィルターに発せられる光は次に蛍光マイクロタイター・プレート・リーダーを使用して感知される。バックグラウンド（すなわちpBR322DNA以外の検体について行われた操作によるスポット由来の放射）以上の放射は検定溶液中のpBR322 20 検体の存在を示す。

#### 実施例X

実施例IIに記述される16-merの、 $-O-PO_3-NH(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-NH_2$  グループと5'-ヌクレオチドの炭素5'位で結合した付加物は、ヘキサメチレンジアミンの代わりにシスタミンが使用されることを除いて、チュー（Chu）及びオーゲル（Orgel）、DNA4、327～331ページ、1985年の操作により調製される。本ジスルフィド付加物から、 $-O-PO_3-NH(CH_2)_2-SH$ と5'-ヌクレオチドの炭素5'位で結合した（2-チオエチル）アミノ付加物が0.1M DTTと1時間室温でインキュベートすることにより調製される。該チオ付加物は次に、1mM DTT存在下、RPC-5を使用する高性能液体クロマトグラフィーにより非還元ジスルフィド付加物から単離される。

MDV-1 RNAの、 $-O-PO_3-NH(CH_2)_2-SS(CH_2)_2-NH_2$ と5'-ヌクレオチドの炭素5'位で結合した付加物は実施例Iで記述されるように調製される。同操作由来の生成物を含む、エタノール沈澱ジスルフィド付加物は次に0.1M DTT中に溶解され、結果としてできる溶液は1時間 40 室温でインキュベートされ、対応するチオ付加物を与える。

MDV-1 RNAのチオ付加物約50ngを含有する、0.1M DTT溶液50μlが、16-merのチオ付加物10倍モル過剰量（すなわち、HDLC精製に由来する溶液量で、該チオ付加物を約30ng含有する。）と合わされる。結果としてできる溶液にO<sub>2</sub>気流が15分間通され、2つのチオ付加物で生ずる反応は一晚室温で進行することが許容される。ゲル電気泳動を使用し、ジスルフィド含有骨格を介して16-merに結合したMDV-1 RNAは、他のMDV-1 RNA付加物及 50

び未反応16-mer付加物から分離される。

ジスルフィド含有骨格を介して16-merに結合したMDV-1 RNA付加物は次に、MDV-1 RNAビオチン-アビジンの代わりに、実施例IIIの操作に従いML3mp8DNAの同定に供される。

#### 実施例XI

本実施例は、本発明に基づくレポーター・システムを使用する、細胞表面上の特異的抗原の同定を記述する。ここで記述される操作は一部、ホラン-ハンド（Horan-Hand）ら、Cancer Research 43巻、728～735ページ（1983年）の教示に基づく。

本操作は標準技術によつて調製された、検定される抗原に対する、ネズミモノクローナルIgG抗体によつて例示される。当業者は、該抗原検体に特異的な、他の型の抗体もまた使用されうということを把握するだろう。

（a）単一層培養細胞を使用する操作：

試験されるべき細胞は、平端な96穴フラット・ボトム組織培養プレート内に、適当な成長培地とともに植えられ、37℃で24時間インキュベートされる。成長培地は次に10%（W/V）ウシ血清アルブミン（BSA）を含有する成長培地と交換される。60分間のインキュベーション後、10% BSA含有培地は除去され、ウェルは洗浄溶媒（1%（W/V）BSAを補った、RPMI 1640溶媒）で洗浄される。該洗浄溶媒は次に除去され、ウェル当たり、PBS中0.1mg/mlで、該抗原検体に対するモノクローナル抗体50μlと交換され、該混合物は4℃で2時間インキュベートされる。インキュベーション後、未結合抗体は抗体溶液のアスピレーションにより除去され、続いて洗浄溶媒を用いて洗浄される。洗浄に続いて、各ウェルに洗浄溶媒を用いて1:1000に希釈した、ビオチニル化ウサギ抗血清IgG（ベクター・ラボラトリーズ、バーリングアム、カリフォルニア州、米国から購入したもの）が加えられ、同溶液はウェル中、4℃で2時間インキュベートされる。該抗-IgG抗体溶液は次にウェルからアスピレートされ、ウェルは洗浄溶媒を用いて再度洗浄される。次に各ウェルに実施例IのMDV-1 RNAビオチン-アビジン付加物のPBS溶液50μlが、1～10μg/mlで加えられ、同溶液はウェル中4℃で2時間インキュベートされる。本溶液は次にウェルからアスピレートされ、ウェルは洗浄溶媒で3回洗浄される。トリス-HCl緩衝液（pH7.5）中0.1M DTT50μlが次に各ウェルに加えられ、1時間室温でインキュベーションが行われる。次に、96指-アリコツターを使用して各ウェルから上清が新しいマイクロタイター・プレートに除去され、実施例IIの操作に従い、同溶液はQβレプリカーゼ溶液と合わせられて組換えMDV-1 RNAに対する検定が行われる。

（b）懸濁液中の細胞を使用する操作：

懸濁液中の細胞は、単一層培養細胞に対して使用される操作による特異な抗原に対して、次の修飾をすることによつて試験されう：



細胞が単一細胞懸濁液（例えば、血清由来のリンホサイト）の形で得られない場合、適当に処理され、そのような懸濁液を調製する。例えば、組織培養由来の細胞は標準技術によりトリプシン処理され、培養容器表面から解離させることが可能で、結果としてできる溶液は次に、培養容器から適当な溶媒中にビベットで移すことが可能である。

単一細胞懸濁液中の細胞は次にマイクロ・タイタープレート（Well）に分けられ、添加されたBSAを含まないRPMI 1640溶媒を用いて2度洗浄される。懸濁液中の同細胞は次に2時間4℃で、Well当たり、注目している抗原に対する抗体のPBS中0.1ml/mlのものを50μgとともにインキュベートされる。

本操作の残りは単一層培養細胞に対する操作と同じである。懸濁培養中の細胞の洗浄はベレットを生ずる遠心分離、培地のアスピレーション、次いで、新たな溶媒（洗浄溶媒）中でのベレットの再懸濁化、再ベレット化及び溶媒のアスピレーションのサイクルによつて行われる。

本実施例の操作に対して、抗原検体を含まないとして知られる、細胞が対照として使用されうる。

本実施例で上述される操作は、抗原検体に結合する初期抗体へのビオチニル化第2抗体の結合を含む。又は、初期抗体自体は、ビオチニル化が、その抗原検体に特異的に結合する能力をなくさないとするればビオチニル化が可能であり、第2抗体結合工程が避けられる。抗体のビオチニル化は、イマム（Imam）ら、Cancer Research 45巻、263-271ページ（1985年）の操作に従い、抗体のN-ヒドロキシサクシニミドビオチンとの直接反応により実行される。

#### 実施例XII

本実施例は本発明に基づく、細胞溶解質、血清または他の溶液から蛋白質を同定する検定の使用を記述する。記述される操作は「ウェスタン・ブロット（Western blot）」法の一型式である。

細胞が関与する場合、細胞溶解質が、2%ドデシル硫酸ナトリウム、2%2-メルカプトエタノール及び10%グリセロールを含有するトリス-HCl緩衝液（pH6.8）溶液（100℃）を用いて可溶化するような標準操作によつて調製される。

該溶解質（または血清または他の溶液）は次にデユブリケート中ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供されるが、隣接するレーンにマーカーとして同定されうる蛋白質を移動させる。標準的なブロットティング装置（例えば、トランス・ブロット装置、バイオ・ラット・ラボラトリス、リッチモンド、カリフォルニア州、米国）を使用し、該蛋白質はゲルからニトロセルロース・シートへ移される。実験ゲルレーンのひとつ及びマーカーゲル・レーンはクーマーシー・ブルーを用いて染色される。該蛋白質検体を含有する可能性のあるゾーンは、試料中

に存在するとすれば次に実験レーンから切断される。検体を含有する可能性のあるゲルゾーンに対応するニトロセルロースペーパーのゾーンはペーパーから切断され、蒸留水中3（W/V）BSAを用いて1時間37℃で浸され全ての非特異的蛋白質結合部位を飽和させる。

親和性分子として該蛋白質に対するビオチニル化抗体を使用して、該蛋白質検体がニトロセルロース片上にあるかを試験するために次の実施例の操作が行われる。

#### 実施例XIII

10 本実施例は本発明に基づく検定を用いる、細胞表面糖蛋白質の同体を例示する。本実施例の操作はゴードン（Gordon）及びペナ（Pena）、Biochem.J.208巻、351～358ページ（1982年）のそれを変えたもので、彼らはイイラミナーゼ処理、培養、正常及び異常それぞれのヒト・皮膚繊維芽細胞上の特異的細胞表面糖蛋白質を同定するためのビーナツツ凝集素及びヒマノ実凝集素を使用した。

細胞は培養皿上に約 $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で植えられ、24時間後、同細胞は洗浄され、2%（W/V）ドデシル硫酸ナトリウム、2%（W/V）2-メルカプトエタノール、10%（V/V）グリセロール、0.01%プロモフェノール・ブルーの0.125Mトリス-HCl緩衝液（pH6.8）溶液（100℃）を用いて可溶化される。該溶解質は次にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供され、蛋白質はトランス・ブロット装置（バイオ・ラットラボラトリス）を使用してニトロセルロースシートへ移される。該ニトロセルロースシートは約5 cm<sup>2</sup>の大きさの切片に切断される。結果としてできるニトロセルロース片は3%

30 （W/V）BSA水溶液に1時間37℃で浸され、全ての非特異的蛋白質-結合部位を飽和する。該片は次にHBS溶液（137mM NaCl、2.7mM KCl、0.9mM CaCl<sub>2</sub>、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、39mMヘベス、pH7.4）を用いてすすがれ、ビオチニル化レクチン（該溶解質の糖蛋白質上の注目している炭水素骨格に適切なものである）とともに、3%BSAを含有するHBS溶液中10mg/mlにおいて、1時間室温でインキュベートされる。ビオチニル化レクチンは市販品であり、例えばベクター・ラボラトリス（ベーリングームカリフォルニア州）、から得られる。該片は次に、HBS溶液を用いて30分間4回浸たすことにより充分洗浄され、実施例IのMDV-1 RNAビオチン-アビジン付加物0.5mlと、PBS中約5 μg/mlで1時間、室温でインキュベートされる。アビジン-ビオチンMDV-1 RNA付加物とのインキュベーション後、過剰の付加物はHBSを用いて3回洗い流される。該片は次にトリス-HCl（pH7.5）中0.1M DTT0.5mlと1時間インキュベートされ、結果としてできる溶液は、QβレプリカーゼにRNA複製を触媒させて、実施例IIの操作によりMDV-1 RNAに対する検定が行われる。

#### 実施例XIV

50 生物標本（例えば、細胞培養、組織、血液、他の体液、食品材料など）由来の核酸は、本発明に基づく検

定、すなわち、第一に核酸をひき出す標準技術（例えば、標本約5  $\mu$  lを45°Cで20分間、30mMトリス-HCl、2 mM EDTA、3%トライトンX100、300  $\mu$  g/mlプロテアーゼ K、pH7.5）約5  $\mu$  lから約1mlとともにインキュベートすることにより標本を破壊し、次に結果としてできる溶液を固体担体（例えばニトロセルロース）上にプロット、そして実施例III〜Xに記述されるような操作を行い該核酸検体を同定することによつて検体断片または検体分子に対する検定が行われる。

このような検定における対照は、検定されている生物標本と同じであるが検体を含まないことが知られているものでありうる。

標本中の検体量の定量的評価のために、既知量の検体に加えられた対照が実験され、標本中の検体量が、試験標本に由来する複製型RNAの複製率と対照に由来する複製率とを比較することにより評価されうる。

#### 実施例XV

実施例IXの操作が、非修飾リボヌクレオシド3リン酸が複製反応において使用され、複製RNAが次のように同定されることを除いて、流用される：

整数比希釈（等容量のもの）された複製反応溶液が96-指アルコツターを用いてジエチルアミノエチルセルロースペーパーのシートに移される。

該シートは次に室温で200mM NaCl、300mM酢酸アンモニウム（pH6.0）溶液中洗浄され、RNA中にとり込まれなかつたリボヌクレオシドを除去する。

該シートは次に0.3  $\mu$  g/ml臭化エチジウムを用いて染色される。シャープ（Sharp）ら、Biochemistry 12巻、3055〜3063ページ（1973年）及びベイリー（Bailey）及びデビッドソン（Davidson）、Anal.Biochem.70巻、75〜85ページ（1976年）を見よ。

最後に個々のプロットからの蛍光がいくつかの既知技術のいずれかひとつによつて測定される。対照プロット由来の蛍光強度以上の、染色プロット由来のそれは染色プロットに対応する試料プロット中の検体（すなわちpBR322）の存在を示す。

他の染色材料が臭化エチジウムの代わりに使用されうる。これらの中にはメチレン・ブルー（ディングマン（Dingman）及びピーコック（Peacock）、1968年上記）；銀染色（サモンズ（Sammons）、1981年、上記；イグロイ（Igloi）、1983年、上記）；またはフィコビリ蛋白質-Q $\beta$ レプリカーゼ共役体（オオイ（Oi）ら、1982年、上記；ストライヤー（Stryer）ら、上記）が含まれる。

さらに、蛍光測定よりもむしろ、RNAの染色に由来するプロットの色が評価されうる。

#### 実施例XVI

大腸菌K-12/600株の培養物がpBR322を用いて形質転換され、テトラサイクリン存在下 $10^8$  cells/mlまで培養される。0.1mlの培養液が30mMトリス-HCl、2mM EDTA、

3%トライトンX-100、300  $\mu$  g/mlプロテナーゼK（pH7.5）溶液の0.1ml、1ml、10ml、100ml及び1000mlのそれぞれに合わされ、結果としてできる溶液45°Cで20分間加熱される。

対照溶液がテトラサイクリン非存在下pBR322を用いて形質転換されていない大腸菌K-12/600株を $10^8$  cells/mlまで培養し、次に同培養液0.1mlと上記で特定したプロテナーゼK溶液0.1mlとを合わせ、結果としてできる溶液を20分間45°Cで加熱することにより調製される。

次に各5試験溶液の各3試料及び対照溶液の3  $\mu$  lが、ニトロセルロース担体上へドット・プロットされる（標準96-穴配列中、96スペースの18スペースに施される）。該担体は次に400mM NaOHを用いて飽和させたペーパー・タオルの先端におかれ、DNAを変性、次に連続的に（a）400mMトリス-HCl、pH7.0（b）20 $\times$ SSC及び（c）10 $\times$ SSCで飽和させたペーパータオルと接触される、最後に該ニトロセルロースシートは80°Cで90分間焼かれる。

実施例IXの30-merが、実施例I及びXの操作に従い、式-O(PO<sub>2</sub>)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(PO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O-という骨格〔ここで、フオスフォラミデートグループは30-mer親和性分子及び複製可能RNAの5'-ヌクレオチドの炭素5'位に結合している〕によりMDV-1（+）RNAに結合している。

標準操作に従い、該シートは前ハイブリッド形成され、次に結果としてできる親和性分子MDV-1 RNAハイブリッド形成溶液中3  $\mu$  g/mlで、ハイブリッド形成され、ハイブリッド形成後は洗浄され、ハイブリッド形成されなかつた親和性分子-MDV-1 RNAハイブリッドを除去する。

次に該ニトロセルロースシートはエクテオラ（ECT-EOLA）ペーパー（サリス（Sarris）ら、1982年、上記）シートの先端（または乾燥ペーパー・タオルの先端）におかれる。0.05Mトリス-HCl（pH7.5）中0.1M DTTで飽和した湿つたスポンジが該ニトロセルロース・シート先端におかれる。DTT溶液のペーパータオルへの毛細管移動に伴い、複製型RNAは、該ハイブリッドのジスルフィドの還元により遊離され、エクテオラ・ペーパー（ここで、正電荷により付着される）へ移される複製となる。

該エクテオラペーパーは次に100  $\mu$  g/mlBSA溶液とインキュベートされ、蛋白質結合部位をブロツクする。

該ペーパーは次に実施例IIにおいて記述されるQ $\beta$ レプリカーゼ溶液と15分間インキュベートされる。

15分間のインキュベーションに従い、該ペーパーは20 mM NaCl、5mMリン酸ナトリウム（pH6.5）を用いて洗浄され、とり込まれなかつたリボヌクレオチドを除去する。該エクテオラ・ペーパー上の各プロットの放射活性は次に例えば、96-位 $\beta$ -放射スキヤナー/ディジタイザー（ゴウリアノス（Goulianos）ら、Anal.Biochem.103巻、64-69ページ、1980年）を使用して決定される。

また、該複製は非放射活性リボヌクレオシド3リン酸のみを用いて行われ、RNA量はその固有のUV吸収（例えば、クラテラゼ（Kulateladge）ら、1979年、上記らのフォトリソテイング法による）により決定されうるし、あるいは該エクテオラ・ペーパー上で直接、実施例XVで記述される染色技術のひとつによつても決定されうる。

検定される溶液中のpBR322の存在は該エクテオラ・ペーパー上の対応するRNA複製プロットに由来する、バックグラウンド信号（対照溶液に由来する）以上の信号により示される。

#### 実施例XVII

大腸菌K-12/C600株の培養液（pBR322を用いて形質転換されたもの及びされていないもの）が実施例XVIの場合のように調製される。

次に未希釈対照液、未希釈pBR322-形質転換培養液、1:10希釈pBR322-形質転換培養液、1:100希釈pBR322-形質転換培養液、1:1000希釈pBR322-形質転換培養液及び1:10000希釈pBR322-形質転換培養液（全ての希釈は細胞非存在培養培地を用いる）それぞれの各3試料がポリプロピレン・マイクロ遠心分離チューブに加えられる。各ウエルに30mMトリス-HCl、2mM EDTA、2%トライトンX-100、300μg/mlプロテナーゼK（pH7.5）溶液5μlが加えられる。該プレートは次に20分間45°Cでインキュベートされる。20分の終わりに、温度が100°Cに上げられ、インキュベーションをさらに5分間続ける。該プレートを室温に冷却後、実施例XVIの親和性分子-MDV-1 RNAハイブリッドの水性塩溶液/フェノール懸濁液8μlが5μg/mlで各ウエルに加えられ、ハイブリッド形成がコーン（Kohne）ら、（1977年）、上記に従い5 \* 30

\* 分間行われる。

各ウエル由来の水-フェノール混合物は次にアガロースゲル電気泳動に付され、pBR322（親和性分子-MDV-1 RNAとハイブリッド形成したもの及びしないもの）をはるかに小さい新和性分子-MDV-1 RNAから分離する。該ゲルは0.1M DTT、0.05Mトリス-HCl（pH7.5）中に浸され、親和性分子と該RNAとの間のジスルフィドの開裂により複製型RNAを遊離する。

該複製型RNAは次に電気プロッティング（ステルワーク（Stellwag）及びダーベルク（Dahlberg）、Nuc1.Acids Res.8巻、299-317ページ（1980年））によりエクテオラ・ペーパーに移される。

最後に、複製RNAがエクテオラ・ペーパー中に複製プロットされる工程後、実施例XVIの操作が流用され、複製可能RNAの複製、該複製RNAの同定、及び検定される試料中にpBR322が存在するか否かの確認が行われる。

本発明は、RNA-依存性RNAポリメラーゼによるRNA複製に基づくレポーターシステムの使用により達成される感度のために、先行技術のシステムよりも有意に進歩した生物検定システムを含む。これらのレポーターシステムを使用する検定の感度は、親和性分子及び複製可能RNAの非特異的吸着に由来するバックグラウンドのみによつて測定されるべきである。そうでなければ、このような検定の感度は、試料当たり1分子という理論的制限にとどめられるべきである。

本発明はある程度の明細をもつて記述されてきたが、等業者にとつては自明な修飾が本発明の方向から逸脱することなくなされうる。

本発明の様々な特徴は次の特許請求の範囲において提示される。

フロントページの続き

(73)特許権者 999999999

ザ・トラスティース・オブ・コロンビア・ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・ニューヨーク  
アメリカ合衆国ニューヨーク州10027,  
ニューヨーク, ブロードウェイ・アット・ウェスト・ワンハンドレッドアンドシックスティーンズ・ストリート（番地なし）

(72)発明者

チュー, バーバラ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92014,  
デル・マー, リュート・レ・バルク  
13716, アパートメント シー

(72)発明者

クレイマー, フレッド・アール  
アメリカ合衆国ニューヨーク州10463,  
ニューヨーク, ウェスト・トゥーハンド  
レッドアンドサーティファースト・スト  
リート 561

(72)発明者

リザルディ, ボール  
メキシコ合衆国モレロス, クエルナバ  
サ, アベニュー・ディアズ・オルダズ・  
エスクワイア・アトラコムコ501, ハ  
ウス・ナンバー 9

(72)発明者

オージェル, レスリー・イー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,  
ラ・ホーラ, テリーヒル・ドライブ  
6102